

Universidad Pablo de Olavide
Departamento de Biología Molecular e Ingeniería
Bioquímica

Centro Andaluz de Biología Molecular
y Medicina Regenerativa
CABIMER

EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL ÓXIDO NÍTRICO SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS

Presentada por:
Alonso Rafael Tapia
Limonchi

Dirigida por:
Dr. Juan R. Tejedo Huamán
Dr. Francisco J. Bedoya Bergua

cabimer

CENTRO ANDALUZ DE BIOLOGÍA MOLECULAR
& MEDICINA REGENERATIVA



Sevilla, 2013



Universidad Pablo de Olavide

Departamento de Biología Molecular e Ingeniería Bioquímica

CABIMER Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa

Título de la tesis:

“EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL ÓXIDO NÍTRICO SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS”

Tesis doctoral para optar el título de Doctor

Presentada por:

Alonso Rafael Tapia Limonchi

Dirigida por:

Dr. Juan R. Tejedo Huamán

Dr. Francisco J. Bedoya Bergua

Sevilla, 2013



Dr., **Juan R. Tejedo Huamán** profesor titular de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad, y Dr. **Francisco J. Bedoya Bergua**, catedrático de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Pablo de Olavide profesor contratado-doctor de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Pablo de Olavide

CERTIFICAN QUE:

El trabajo de investigación presentado por Don **Alonso Rafael Tapia Limonchi** titulado ***“EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL ÓXIDO NÍTRICO SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS”*** ha sido realizado bajo su supervisión y dirección, y reúne los requisitos de originalidad y calidad científica necesarios para constituir una Tesis Doctoral y optar al grado de Doctor por la Universidad Pablo de Olavide de Sevilla.

Y para que así conste y a efectos oportunos, firman el presente informe.

VºBº de los directores del trabajo.

Profesor Dr.
Francisco J. Bedoya Bergua

Profesor Dr.
Juan R. Tejedo Huamán

Sevilla, 05 de Febrero de 2013.

Índice

Índice

AGRADECIMIENTOS	10
ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS.....	12
I. INTRODUCCIÓN.....	13
I.1 Definición de células madre	14
I.2 Tipos de Células Madre	15
I.3 Potencial Terapéutico de las Células Madre.....	16
I.4 Células madre embrionarias (CMEs).	17
I.5 Autorrenovación y Pluripotencia.	20
I.6 Diferenciación celular en CMEs	22
I.7 Regulación Génica.....	25
I.8 El óxido nítrico como molécula de señalización durante el desarrollo.....	29
I.9 Papel del óxido nítrico durante el desarrollo.....	31
I.10 Señalización en CMEs reguladas por el Óxido Nítrico.....	32
I.11 Efectos del óxido nítrico dependiente de dosis.....	34
I.12 Diferenciación de células madre embrionarias inducida por el óxido nítrico.....	37

I.13 Diferenciación de las CMEs inducida por óxido nítrico hacia cardiomiocitos y tejidos vasculares.....	38
I.14 Diferenciación de la CMEs hacia tejido neuronal inducida por óxido nítrico.....	40
I.15 Participación del óxido nítrico en la diferenciación de CMEs hacia endodermo.....	41
I.16 El óxido nítrico y la regulación de la expresión génica en células madre embrionarias.	42
I.17 Otras funciones celulares afectadas por el óxido nítrico sobre las células madre embrionarias.....	45
<u>II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</u>	48
<u>III. MATERIALES Y METODOS</u>	52
III.1 Líneas de Células Madre Embrionarias utilizadas.	53
III.2 Cultivos celulares.....	53
III.3 Aislamiento de ARN total.	55
III.4 Transcripción reversa y PCR cuantitativa en tiempo real. ...	55
III.5 Preparación del ARN complementario (ARNc) y del microarray de ADNc.....	56
III.6 Análisis de expresión génica a partir de los datos de los microarrays.	57

III.7 Ensayo de Fosfatasa alcalina.	59
III.8 Microscopía de fluorescencia.....	59
III.9 Análisis de inmunodetección.....	60
III.10 Ensayos de Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP).....	60
III.11 Ensayos de proliferación celular.	62
III.12 Sincronización y análisis del ciclo celular.	62
III.13 Análisis de formación de teratomas.	63
III.14 Análisis estadístico.....	63
IV. RESULTADOS	64
IV.1 Las células madre embrionarias de ratón producen niveles homeostáticos de óxido nítrico.	65
IV.2 Expresión y estabilidad de marcadores de autorrenovación y pluripotencia en las líneas celulares D3-pOct4-eGFP y D3-pOct4-eGFP-eNOS.	68
IV.3 Impacto de diferentes concentraciones de óxido nítrico exógeno sobre la regulación de marcadores de autorrenovación y diferenciación en CMEs de ratón.....	71
IV.4 La sobreexpresión endógena de eNOS mantiene las CMEs de ratón en un estado no diferenciado.....	74

IV.5 Efecto del óxido nítrico sobre la apoptosis inducida por la ausencia de LIF en CMEs de ratón.	77
IV.6 Mantenimiento de la autorrenovación en CMEs de origen humano.	79
IV.7 El ensayo de formación de teratomas confirma la identidad pluripotente de las CMEs tratadas con bajas concentraciones de óxido nítrico.....	84
IV.8 El óxido nítrico modifica la expresión de genes relacionados a la red de regulación transcripcional de la autorrenovación.....	87
IV.9 Análisis del transcriptoma revela efectos globales del óxido nítrico en la expresión génica de las CMEs de ratón.....	90
IV.10 El tratamiento con óxido nítrico modifica el transcriptoma de las CMEs humanas de manera análoga al de las CMEs de ratón.	96
IV.11 El tratamiento con óxido nítrico modula la expresión de genes involucrados en muerte celular y regulación del ciclo celular.	99
IV.12 Impacto del óxido nítrico sobre la actividad transcripcional de genes de desarrollo, diferenciación y remodelación de la cromatina.....	105
IV.13 El efecto del óxido nítrico sobre la autorrenovación y pluripotencia favorece la conexión de genes del metabolismo mitocondrial-muerte celular y respuesta similar a hipoxia.....	111

<u>V.</u> DISCUSIÓN	115
VI. CONCLUSIONES	150
<u>VII.</u> ANEXOS.....	154
<u>VIII.</u> BIBLIOGRAFÍA	170

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis no hubiese sido posible sin el apoyo y la confianza depositada en mi persona por Juan Tejado, Francisco Bedoya y Bernat Soria, y sobre todo el darme la oportunidad de abrir un camino en mi inquietud científica al trabajar con células madre. Muchas gracias por su notable experiencia, enseñarme a marcar las pautas, manejar los tiempos y aprender a sobrellevar los malos ratos que tiene muchas veces el quehacer científico, y que a la larga forman el carácter de aquellos que nos dedicamos a vivir entre “papers” y pipetas.

Durante estos años como estudiante de doctorado he aprendido y enriquecido enormemente mis conocimientos científicos, por estar en contacto con gente que muchas veces había que arrancarlos de la pantalla del ordenador o que vivían en las campanas de cultivo con los que he compartido entrañables experiencias. Sergio Mora con quien pasamos muchas horas de discusión de artículos científicos durante los primeros años y que fueron determinantes para comprender las intrincadas interacciones de vías de señalización o redes que para muchos solo yo las entiendo. Mis dos extremos Marcela Garita y Daniela Pezzolla, que me han acompañado a lo largo de estos años y con las que la retroalimentación y discusión de protocolos además de una perfecta amistad dentro y fuera del laboratorio llenaron muchas veces los vacíos de vivir fuera de casa. El ramillete de flores que me ha acompañado en estos últimos años en la familia MR2, Carmen Salguero, Estefania Caballano y Amparo Beltran, quienes con su inteligencia y excelente actitud para la ciencia han sabido también ponerme a prueba y contribuido a sacar ese lado casi oscuro que es el de aportar mis conocimientos y dos de las técnicas más capaces y eficientes que un laboratorio puede tener Ana Belen Hitos e Irene Díaz, que con su ingenio y creatividad han sabido muchas veces darle solución a cualquier problema

técnico, además de darle vida y experiencia al laboratorio. En la unidad de genómica de CABIMER, Eloisa Andujar y Mónica Perez por el gran apoyo en los análisis de microarrays. Al personal técnico de CABIMER: Paloma Domínguez, Mercedes Dana, María José Quinteros, María José Figueroa, Cindy Cruz y Dolores Marin. A todos ellos estaré por siempre agradecido

Así mismo, debo agradecer a los investigadores y amigos como: Karim Hmadcha, Fran Martin, Anabel Rojas, Petra Lorenzo por haber compartido conmigo su experiencia y conocimientos, así como haberme ayudado a encontrar esa salida técnica a problemas que se veían “insolubles”.

Más que un agradecimiento, esta tesis va dedicada para mi familia: Mi madre Dora y mi padre Alfonso por haber confiado en mí y haberme apoyado siempre, por las horas que dedicaron a hablarme y a ser pacientes conmigo. Mis hermanas Gaby y Mariela quienes con su cariño siempre me hacen sentir como en aquellos bellos años que vivimos juntos en Santa Marina. Para tí Enriqueta, que me ensañaste a sembrar para después disfrutar el sabor de la buena cosecha. Y para Enrique, Julio y a todos ustedes que están siempre en mi corazón. Gracias por haber estado siempre pendientes y haber aplaudido mis locuras.

ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
bFGF	Factor de crecimiento de fibroblastos básico
BMP4	Proteína morfogénica del hueso 4
BrdU	5-bromo-2-deoxiuridina
cAMP	Adenosín monofosfato cíclico
CBFT	Conjunto básico de factores de transcripción
ChIP	Inmunoprecipitación de cromatina
CME	Células madre embrionarias
DETA-NO	Dietilentriamina-NO
dNTPs	Desoxirribonucleótidos-trifosfato
ERN	Especie reactiva de nitrógeno
ERO	Especie reactiva de oxígeno
FA	Fosfatasa alcalina
GFP	Proteína verde fluorescente
GMPc	Guanosín monofosfato cíclico
GO	Ontología génica
LIF	Factor inhibidor de leucemia
L-NMMA	L-N-monometil-arginina
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintasa
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RT-PCR	Transcripción reversa-PCR
SDS-PAGE	SDS- gel de electroforesis de poliacrilamida
Shh	Sonic hedgehog
SOX	SRY box
TGF- β	Factor de crecimiento tumoral beta
WNT	Acrónimo de la combinación de los genes Wingless e Integration

Introducción

I. INTRODUCCIÓN

I.1 Definición de células madre

Las células madre existen en todos los organismos multicelulares, y aparecen durante los primeros estadios de la embriogénesis. Estas células tienen la capacidad de autorrenovarse mediante divisiones mitóticas o bien de continuar la vía de diferenciación para la que están programadas y por lo tanto producir células de uno o más tejidos adultos que pueden ser funcionales y plenamente diferenciados en función de su grado de potencialidad.

Estas células poseen el potencial extraordinario para convertirse en diferentes tipos de células durante los primeros años de vida, el crecimiento y la formación de órganos y tejidos. En muchos tejidos pueden servir como un tipo de sistema de reparación interno, dividiéndose ilimitadamente para reponer otras células.

La mayoría de los tejidos de un individuo adulto poseen una población de células madre específica que permite su renovación periódica o su regeneración cuando se produce algún daño tisular. Algunas células madre adultas son capaces de diferenciarse en más de un tipo celular como las células madre mesenquimales y las células madre hematopoyéticas, mientras que otras son precursoras directas de las células del tejido en el que se encuentran, como por ejemplo las células madre de la piel o las células madre de las gónadas (células madre germinales).

Debido a sus capacidades regenerativas únicas, las células madre ofrecen un gran potencial para el tratamiento de enfermedades como la diabetes o enfermedades cardíacas. Sin embargo, aun son necesarios mayores esfuerzos en el laboratorio y en la clínica para que finalmente estas células puedan usarse en terapias de medicina regenerativa.

I.2 Tipos de Células Madre

Desde el punto de vista de la investigación, en la actualidad se utilizan dos tipos de células madre provenientes de animales y humanos: Células madre embrionarias (CME) y células madre somáticas (CMS) o adultas. Las células madre embrionarias son líneas celulares de crecimiento indefinido derivadas de la masa celular interna (MCI) del blastocisto, en este grupo también se consideran a las células madre epiblasticas pluripotentes (EpiCM o EpiSC-en ingles) que son derivadas del epiblasto embrionario y poseen propiedades análogas a las CMEs pero difieren en su estado epigenético y a las señales que controlan su diferenciación [1]. Las dos características que mejor definen a las CMEs son su capacidad de autorrenovación *in vitro* combinada con su capacidad para diferenciarse en todos los tipos celulares somáticos.

Por otro lado las células madre adultas están presentes en numerosos tejidos tales como medula ósea, tejido adiposo, intestinos y piel, donde sirven para reemplazar a aquellas células perdidas por daño, desgaste o recambio natural. Son células atípicas, mayormente

quiescentes y que están contenidas en nichos especializados en el cuerpo [2].

Adicionalmente, en 2006 investigadores de la Universidad de Kioto en Japón dieron a conocer sus estudios acerca de la identificación de las condiciones que permitieron “reprogramar” genéticamente células adultas especializadas, concretamente fibroblastos de ratón, para asumir un estado similar al de célula madre pluripotente. A este nuevo tipo de célula madre se le llamo célula madre con pluripotencia inducida (iPSCs – siglas en ingles-) [3]

I.3 Potencial Terapéutico de las Células Madre.

Muchas enfermedades humanas son causadas por deficiencias en la cantidad o funcionalidad de células particulares. Entre estas enfermedades podemos mencionar algunos desordenes neurodegenerativos, ciertas formas de ceguera, de sordera, diabetes y algunos tipos de enfermedades del hígado y corazón. La generación y reemplazamiento de células en estos pacientes podrían mejorar o inclusive curar estas enfermedades [4]. Para hacer realidad el potencial de las células madre embrionarias, es necesario diseñar protocolos de diferenciación que permitan obtener células de tejidos específicos a partir de las células pluripotentes. En la actualidad se han realizado diversos protocolos de diferenciación con resultados promisorios para algunos tipos celulares. La obtención de iPSCs por reprogramación de células provenientes de un paciente en particular es una de las estrategias más novedosas ya que podría permitir generar células diferenciadas personalizadas para cada paciente [5] (Figura 1).

Los avances relacionados con los mecanismos que regulan la diferenciación de las células pluripotentes hacia un tipo de célula en particular han permitido el diseño de estrategias de diferenciación *in vitro*, principalmente a través de la regulación de la actividad de factores de transcripción claves, moléculas de señalización u otras proteínas requeridas para el desarrollo de órganos, algunas veces simulando diversos estadios del desarrollo embrionario Figura 2. Muchas estrategias están basadas en la adición de factores de crecimiento y/o pequeñas moléculas con capacidad diferenciadora [4]).

I.4 Células madre embrionarias (CMEs).

Las células madre embrionarias son líneas celulares de crecimiento indefinido derivadas de la MCI de los blastocistos. Las CMEs bajo condiciones de cultivo apropiadas pueden ser expandidas indefinidamente, propiedad conocida como autorrenovación, mientras conservan su capacidad para diferenciarse hacia cualquier tipo celular somático, propiedad conocida como pluripotencia. Cuando se les retorna al blastocisto, las CME son fácilmente incorporadas en el epiblasto y se re-integran al desarrollo embrionario para producir células funcionales germinales y del soma [6]. Las CMEs también comparten características epigenéticas con epiblastos de pre-implantación. Por ejemplo, las CMEs femeninas de ratón retienen dos cromosomas X activos (Xa) y a partir de la diferenciación estas células inician una inactivación aleatoria del cromosoma X. Además de simular el desarrollo temprano, la inactivación del cromosoma X en las CMEs es importante para cumplir con la apropiada función de la célula y su potencial de desarrollo. El estado activo del cromosoma X en

CMEs en iPSCs puede ser usado como un marcador de pluripotencia, ya que durante la reprogramación de las células somáticas el cromosoma X inactivado (Xi), se reactiva en las iPSCs [7].

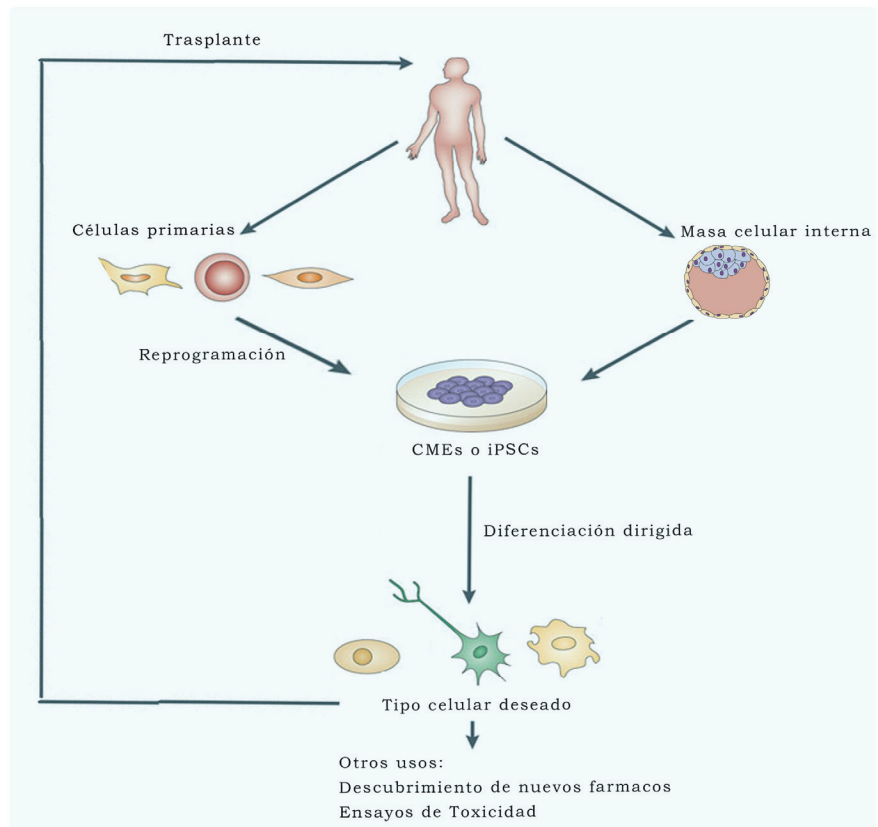


Figura 1. Uso potencial de la terapia celular en medicina regenerativa. Las células pluripotentes derivadas de células adultas de pacientes o donantes (células madre con pluripotencia inducida iPSCs) o aquellas derivadas de la masa celular interna del blastocisto (células madre embrionarias CMEs) pueden ser usadas para medicina regenerativa. Ambas pueden ser derivadas a tipos celulares deseados a través de protocolos de diferenciación específicos y podrían ser usadas para regeneración de tejidos dañados. Además la investigación clínica con estas células derivadas, permite el diseño y ensayo de efectividad y toxicidad de nuevos fármacos (Modificado de [4])

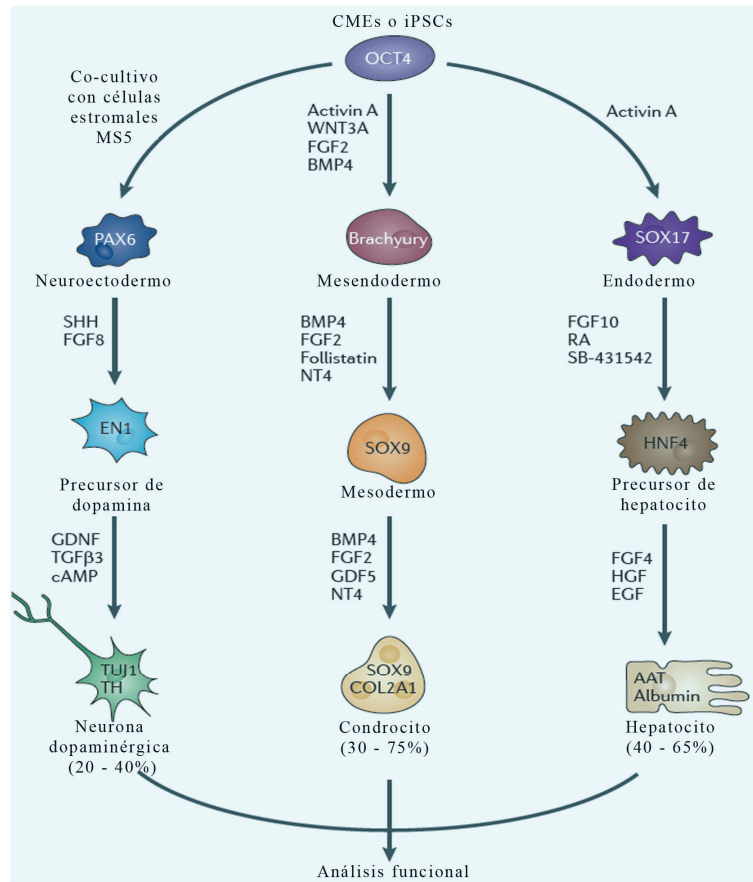


Figura 2. Protocolos de diferenciación dirigida “in Vitro”. Las células pluripotentes (CMEs o iPSCs) pueden ser diferenciadas a varios destinos celulares, dirigiéndolas a través de una serie de estadios intermedios similares a los que ocurren durante el desarrollo in vivo, utilizando en cada estadio factores de crecimiento y/o pequeñas moléculas conduciéndolas hacia el destino celular deseado. (Modificado de [4]). Shh: Sonic hedgehog; NT4: Neurothrophin 4; RA: Retinoic acid; GDNF: Glial cell line-derived neurotrophic factor; GDF5: Growth differentiation factor 5; HGF: Hepatic growth factor; EGF: Epidermal growth factor; AAT: Alpha-1-antitrypsin; COL2A1: Collagen, type II, alpha 1; Tuj: class III beta-tubulin; TH: Tyrosine hydroxylase; EN1: Engrailed 1; SB431542: 4-[4-(1,3-benzodioxol-5-yl)-5-(2-pyridinyl)-1H-imidazol-2-yl] benzamide (inhibidor de TGFβ)

I.5 Autorrenovación y Pluripotencia.

La capacidad de autorrenovación y la pluripotencia son características esenciales de las CMEs que permiten su uso potencial como una fuente celular para reemplazamiento de tejidos [8]. Las CMEs de ratón pueden ser mantenidas en un estado pluripotente no diferenciado cuando son cultivadas sobre una capa de células nodrizas de fibroblastos (*feeder layers*) que tienen inactivado su crecimiento, o en placas adherentes en medio suplementado con el factor inhibidor de leucemia (LIF), una citoquina miembro de la familia de la IL-6 [9]. Las CMEs humanas también pueden ser mantenidas sobre *feeder layers*, y sobre placas de cultivo recubiertas con matrices extracelulares en medios de cultivo condicionados sobre cultivos de fibroblastos, actualmente estos medios son suplementados con suero de reemplazamiento y factor de crecimiento de fibroblastos (bFGF). Los cultivos sobre capas de células nodrizas de fibroblastos adicionan dificultades logísticas para la propagación de CMEs de humanas y su preparación requiere tiempo y esfuerzo, además la senescencia de los fibroblastos después de 5 a 9 pases puede variar significativamente en su capacidad para sostener el crecimiento de las CMEs [10].

A nivel molecular las CMEs poseen un conjunto básico de factores de transcripción (CBFT), que funcionan para mantener el estado pluripotente de estas poblaciones celulares, compuesto principalmente por Oct4 (Pou5f1), Nanog y Sox2, los cuales co-ocupan regiones promotoras de genes que están involucrados en el mantenimiento de la pluripotencia y diferenciación de linajes tempranos.

Dos conceptos claves permiten entender la función de estos factores básicos, en el control del estado de “célula madre”. i) Los componentes del CBFT funcionan juntos para regular positivamente sus propios promotores formando un circuito auto-regulatorio interconectado. ii) Los factores del CBFT co-ocupan y activan la expresión de genes necesarios para mantener el estado de célula madre, mientras contribuyen a la represión de genes que codifican factores de transcripción específicos de linaje, cuya ausencia ayuda a prevenir la salida del estado pluripotente [8, 11].

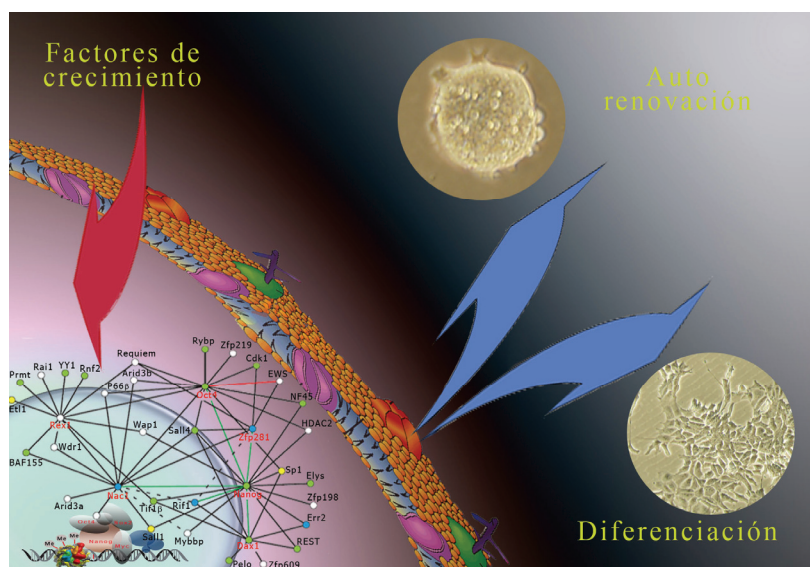


Figura 3. Circuito regulatorio de la pluripotencia en CMEs. La regulación de la expresión génica en las CMEs es controlada por una intrincada red de proteínas que regulan positivamente la expresión de genes de pluripotencia, mientras que mantienen reprimidos genes de diferenciación tejido específico. Estas proteínas comprenden a Nanog, Sox2 y Oct4 como reguladores principales interconectados con: reguladores de cromatina y otros factores de transcripción.

En los últimos años, se han identificado un grupo de proteínas que interactúa con el CBFT. La red está altamente enriquecida por factores nucleares que individualmente son críticos para el mantenimiento del estado de célula pluripotente y que funcionan como co-reguladores durante la diferenciación. La red está interconectada a múltiples vías de activación y co-represión génica y está compuesta por numerosas proteínas incluyendo factores de transcripción, cofactores, reguladores de cromatina, así como reguladores de ARN no codificantes [8, 12]. En la figura 3 y en la tabla 1 se describe a los principales componentes de la red de mantenimiento de la pluripotencia.

I.6 Diferenciación celular en CMEs

A partir de la remoción de los factores que las mantienen pluripotentes, las CMEs se diferencian y bajo condiciones apropiadas generan progenie derivada de las tres capas germinales embrionarias: mesodermo, endodermo y ectodermo. Los métodos generales utilizados para iniciar un protocolo de diferenciación de las CMEs son tres. En el primer método las CMEs son inducidas a agregarse y formar colonias tridimensionales conocidas como cuerpos embrionarios (CEs). En el segundo método, las células son cultivadas directamente sobre células estromales y al contacto con estas, se da lugar a la diferenciación.

Tabla 1. Reguladores transcripcionales implicados en el control de las CMEs (extraída de Ref.4)

Función	Tipo de regulador
Factores de transcripción	
Conjunto básico de factores de transcripción (CBFT)	Nanog, Oct4, Sox2, Mediator, Cohesin
Señalización por Wnt para el CBFT	Tcf3
Señalización por LIF para el CBFT	Stat3
Señalización por BMP para el CBFT	Smad1
Señalización por TGF- β /Activina/Nodal para el CBFT	Smad 2/3
Proliferación	cMyc
Receptor de hormona esteroidea	Esrrb
Regulador embrionario	Sall4
Intermediario de señalización de LIF	Tbx3
Autorrenovación	Zfx
Metabolismo	Ronin
Señalización por LIF	Klf4
Identidad de las CMEs	Prdm14
Cofactores	
Conjunto básico de factores de transcripción (CBFT)	Mediator, Cohesin
Acopla transcripción con modificación de histona	Complejo Paf1
Inhibidor de Oct4	Dax1
Cofactor Zfx/Myc	Cnot3, Trim28
Reguladores de cromatina	
Silenciadores de reguladores de linaje-específicos	Complejo polycomb, SetDB1 (ESET)
Movilización del nucleosoma	esBAF, Chd7, Chd1
Acetilación de histona	Tip60-p400
Reguladores de ARNs no codificantes	
Modulación de los transcritos de pluripotencia	micro ARNs ARNs no codificantes ricos en GC
Reclutamiento de los complejos polycomb	GC

El tercer método involucra la diferenciación de CMEs en una monocapa sobre proteínas de matriz extracelular. En un escenario ideal, la diferenciación de las CMEs podría ser dirigida hacia una población pura del tipo celular deseado. Por ejemplo mediante condiciones de cultivo específicas permitir la formación de células progenitoras neurales. Es importante resaltar que para llevar a cabo protocolos de diferenciación eficientes, es imprescindible partir de poblaciones de células no diferenciadas en condiciones estables y que han sido sometidas al menor número de pasajes posible. Es por esta razón que la investigación que involucra la búsqueda de medios de cultivo alternativos que no dependan de componentes de origen animal o xenobiótico y que a su vez mantengan estables e indiferenciadas a las CMEs, ha tomado singular relevancia en los últimos años.

A pesar de los rápidos avances llevados a cabo en la diferenciación de las CMEs, es interesante anotar que la diferenciación controlada hacia linajes definidos es diferente de la selección y del enriquecimiento específico durante la diferenciación. El control de la diferenciación requiere un entendimiento de las vías genéticas que regulan las decisiones de destino después de la pérdida del fenotipo de célula madre [10]. En los últimos años, ha crecido el número de aportes en el conocimiento de los mecanismos que operan durante estos cambios y que dependen de la aplicación de factores de crecimiento o el cultivo en medios selectivos, que inician la conversión de un subconjunto de células en un linaje deseado o promueven la supervivencia de un subconjunto a expensas de otro. La elucidación de estos mecanismos, se viene llevando a cabo gracias a técnicas que permiten el análisis de genomas o transcriptomas completos sobre

diversas poblaciones celulares, usando formatos de gran escala como plataformas de *microarrays*.

I.7 Regulación Génica.

Las CMEs son únicas en su capacidad para autorrenovarse y diferenciarse. En los últimos años ha recibido considerable atención el concepto de que la determinación y mantenimiento de la pluripotencia y autorrenovación de las CMEs están relacionados a un estado epigenético caracterizado por una conformación abierta de la cromatina. Esta cualidad “antagónica” es en parte promovida por factores específicos de células madre. Durante la diferenciación factores específicos de linaje activan la expresión de genes específicos que son requeridos para que cada linaje forme redes de transcripción jerárquicas [13]. De esta manera, tenemos que la cromatina de las CMEs es morfológicamente distinta, en ese sentido la heterocromatina está organizada en dominios más grandes y más escasos, los cuales se vuelven más pequeños, más abundantes e hipercondensados conforme las células se van diferenciando [14].

En primera línea, estas diferencias en los patrones de expresión génica son orquestados por programas epigenéticos definidos que aparecen preferentemente para ciertos factores de transcripción diana. Como consecuencia, un conjunto limitado de modificaciones epigenéticas pueden alterar indirectamente la expresión de cientos hasta miles de genes, demostrando así la eficiencia de este tipo de control sobre el establecimiento de identidades celulares. Por ejemplo, la metilación del ADN es una modificación epigenética que resulta en la

adición de un grupo metil a residuos de citosina de dinucleótidos CpG. La importancia de la metilación del ADN en la diferenciación de las CMEs fue demostrada por el hallazgo de que la deleciones homocigóticas de cualquier gen que codifica para la ADN metil transferasa de mantenimiento: Dnmt1, y las ADN metil transferasas de novo: Dnmt3a y 3b o de otras proteínas de unión a islas CpG que forman parte de complejos de metilación de ADN, en líneas de células germinales de ratón, permitieron la hipo-metilación global y un completo bloqueo de la diferenciación de las CMEs. Esta información sugiere que el genoma de las CMEs no diferenciadas se encuentra hipometilado y progresivamente se va metilando durante la diferenciación [15, 16], [17].

Consecuentemente, las proteínas estructurales de la cromatina tales como: el componente de heterocromatina HP1, la histona de enlace H1 y el conjunto de las otras histonas despliegan una unión hiperdinámica y flexible para la cromatina de las CMEs no diferenciadas en comparación a la de las células diferenciadas [18]. En los últimos años se han publicado numerosos artículos sugiriendo que la diferenciación de las CMEs está también asociada con cambios en las modificaciones de histonas y alteraciones en la estructura de la cromatina. Las histonas están sujetas a algunas modificaciones post-traduccionales que ocurren principalmente en los extremos amino-terminales; estas incluyen: metilación, acetilación, fosforilación, sumoilación y ubiquitinación. Así, por ejemplo la acetilación de residuos de lisina en las histonas por histona-acetil-transferasas (HATs) está asociada con estructuras de cromatina permisiva, mientras que la

remoción de grupos acetilo por histona-deacetilasas (HDACs) está asociada con cromatina represora [19, 20].

La diferenciación de las CMEs está acompañada por un incremento en la histona 3 trimetilada en la lisina 9 H3K9me3 y la acetilación de la histona H3 y H4. Al mismo tiempo el bloqueo de la actividad de las histona-deacetilasas previene la diferenciación de las CMEs. Estudios sobre los perfiles de metilación de las histonas mediante el mapeo completo del genoma (*genome wide*) revelaron la existencia de un singular patrón de metilación, llamado “dominios bivalentes”. Estos dominios bivalentes están compuestos de grandes regiones de marcas de histonas represivas histona 3 trimetilada en la lisina 27 (H3K27me3) en las que se albergan simultáneamente regiones más pequeñas de cromatina permisiva marcada por H3K4me3. Estos dominios bivalentes están asociados con genes reguladores de la diferenciación y desarrollo embrionario en las CMEs. Durante la diferenciación de las CMEs estos dominios bivalentes son resueltos en regiones amplias usualmente marcadas o por H3K27me3 o H3K4me3.

Estos hallazgos sugieren un modelo en el cual los dominios bivalentes se encuentran silenciando genes involucrados en diferenciación y desarrollo, y a su vez los mantienen en un estado “preparado” (*poised*) para la activación cuando su expresión es inmediatamente necesaria en decisiones de destino [21, 22]. Los cambios en el estado de empaquetamiento de la cromatina son promovidos principalmente por proteínas modificadoras de histonas, conocidas como reguladores de cromatina, e influyen notablemente sobre la expresión génica. Estos reguladores de cromatina son

generalmente reclutados hacia los genes por factores de transcripción de unión a ADN, por la maquinaria de transcripción o por algunas especies específicas de ARN [8, 23]. Los reguladores de cromatina que son conocidos que poseen un impacto más profundo en el estado de las CMEs son las enzimas modificadoras de histonas, las cuales reprimen genes que codifican reguladores del desarrollo específico de linaje. Los modificadores de histonas incluyen a los complejos de proteínas Polycomb (PcG) y al grupo Triterax (TrxG), Setdb1 y Tip60-p400, estos a su vez trabajan junto a las histonas modificadas en la represión (con PcG) o activación (con TrxG) de la expresión génica [8, 17]. Las proteínas TrxG catalizan la tri-metilación de la histona H3 en lisina 4 (H3K4me3) sobre los promotores de genes activos y facilitan el mantenimiento del estado de activación génica durante el desarrollo, en parte antagonizando las funciones de las proteínas PcG

Los complejos de proteínas PcG catalizan la ubiquitinación de la histona H2A en lisina 119 (H2AK119u) y la H3K27me3 y funcionan en las CMEs ayudando a silenciar genes que codifican para reguladores claves del desarrollo, manteniéndolos en el balance de las marcas bivalentes, preparados para la activación durante la diferenciación. Otro grupo de proteínas remodeladoras de la cromatina participan también en la regulación de la expresión génica de las CMEs. El complejo represor remodelador de nucleosoma y deacetilación de histona (Nucleosome Remodeling and Histone Deacetylation (NuRD)), formado principalmente por proteínas con dominio de unión a metil-CpG (MBD) e histonas deacetilasas (HDACs), está implicado en el silenciamiento de genes que participan en las decisiones de destino durante la diferenciación celular y desarrollo hematopoyético [24, 25].

Por otro lado, algunos componentes de complejos remodeladores de nucleosoma dependientes de ATP han sido implicados en el control del estado “stem” en CMEs. Un ejemplo es el complejo BAF (Brahma-related gene (BRG)/Brahma (BRM)-associated factor) ortólogo en mamíferos del complejo de levaduras SWI/SNF (switching-defective–sucrose non-fermenting complex), que se ha encontrado asociado con los promotores de genes que se encuentran bajo el control de Oct4, Sox2 y Nanog. Algunas subunidades centrales de este complejo son esenciales para el mantenimiento de las CMEs [26].

I.8 El óxido nítrico como molécula de señalización durante el desarrollo.

Durante las últimas décadas, el óxido nítrico (NO) ha sido propuesto como una molécula de señalización que regula la supervivencia y la proliferación en diversos tipos celulares. Así mismo, se ha demostrado que afecta la expresión génica a nivel de la transcripción y la traducción. El NO es producido por las isoformas de la oxido nítrico sintasa (NOSs): dos isoformas constitutivas, la eNOS isoforma producida por células endoteliales y la nNOS isoforma neuronal; y una isoforma inducible, la iNOS inducida por varios tipos celulares en respuesta a estímulos inflamatorios y que se expresa constitutivamente en los macrófagos. Estas enzimas se han encontrado expresadas en tejidos embrionarios y recientemente en células madre, por lo tanto es factible que su acción pueda contribuir a la regulación de algunas propiedades de la biología de las CMEs.

Los primeros estudios sobre el desarrollo de diferentes organismos como *Drosophila* y *Xenopus* así como también en mamíferos, asocian al NO con un papel relevante durante la activación del huevo al momento de la fertilización, y está también involucrado en procesos de desarrollo en el embrión [27-29].

Uno de los primeros estudios con CMEs y el papel del NO como molécula involucrada en diferenciación es el reporte de S. Kanno en 2004, para la obtención de cardiomiocitos a partir de la exposición a altas concentraciones de donadores químicos de NO [30]. Este trabajo pionero reveló el potencial de esta molécula para su uso en las estrategias de diferenciación con CMEs y su impacto en medicina regenerativa. En esa misma dirección, experimentos recientes llevados a cabo con donadores de NO y/o activadores de la guanilato ciclasa soluble (sGC) han mostrado un papel importante en diferenciación de CMEs hacia células de miocardio [31].

Un aspecto importante que debe ser tomado en cuenta es el hecho que el NO exhibe un amplio rango de funciones importantes en el organismo y realiza múltiples papeles fisiológicos como molécula de señalización biológica. Similarmente, se ha demostrado que el NO es esencial para la supervivencia de algunas líneas celulares neuronales y de cultivos primarios de neuronas sometidas a diversas señales de muerte celular. Además puede regular negativamente la proliferación de precursores celulares y promover su diferenciación a través de la represión del encogen n-Myc en líneas celulares de neuroblastoma (SK-N-BE) [32].

I.9 Papel del óxido nítrico durante el desarrollo.

Durante el desarrollo de los órganos y tejidos se requiere el establecimiento de un programa estrictamente controlado que coordine la proliferación y muerte celular, la detención del crecimiento y la diferenciación, de tal manera que la maquinaria de especialización celular funcione con una alta fidelidad y eficiencia. Aunque posean un material genético idéntico, las células de cada organismo individual exhiben claras distinciones en su morfología y funciones celulares. Así, la diferenciación celular que se lleva a cabo durante el desarrollo de los organismos multicelulares, al igual que la diferenciación espontánea o dirigida de las CMEs está controlada por intrincados procesos reguladores de vías de señalización específicas de linaje, lo que provoca que las células pierdan gradualmente su plasticidad innata para asumir funciones especializadas. Observando la progresión de tales vías de señalización, es posible predecir el tipo celular resultante del proceso de diferenciación.

Al respecto de lo mencionado, se ha sugerido que el NO podría actuar como un regulador negativo esencial de la proliferación celular durante la diferenciación de tejidos y desarrollo de órganos en *Xenopus* y *Drosophila*, controlando el balance entre la proliferación celular y diferenciación en un tejido en desarrollo. Esto podría inducir o afectar rasgos específicos que caracterizan al tejido diferenciado, acoplando la salida del ciclo celular hasta la obtención del fenotipo diferenciado [27].

Similarmente, estudios en ratones han demostrado que las isoformas de iNOS y eNOS son expresadas temprano durante el desarrollo del corazón embrionario de ratón o rata y que a partir del día embrionario 14.5 son fuertemente reprimidas [33]. Estos estudios son evidencias importantes que demuestran el papel del NO como una molécula implicada en organogénesis y desarrollo, sustentando de esta manera su participación en estrategias de diferenciación para CMEs y células iPS.

I. 10 Señalización en CMEs reguladas por el Óxido Nítrico.

El óxido nítrico es un segundo mensajero muy versátil y que puede difundir fácilmente, debido a su naturaleza gaseosa, se encuentra implicado en numerosas funciones fisiológicas en mamíferos que van desde la dilatación de vasos sanguíneos y relajación muscular hasta la respuesta inmune y potenciación de la transmisión sináptica, y como tal participa activamente en la vía de señalización de NO/guanosina monofosfato cíclico (GMPc) para jugar un papel crucial en funciones: neuronales, plaquetarias, gastrointestinales y cardiovasculares. Adicionalmente, los ratones manipulados genéticamente, triple Knock-out para las tres isoformas de la NOS, y por lo tanto que no producen NO endógeno, presentan una reducción significativa de su tasa de supervivencia y fertilidad [34].

Recientemente, ha cobrado fuerza el planteamiento de que la vía de señalización NO/GMPc tiene un papel significativo en el desarrollo embrionario y la diferenciación celular. Reportes, de diferentes grupos

de investigación indican que las alteraciones en los niveles intracelulares de NO/GMPc afectan la diferenciación de progenitores derivados de medula ósea y de las CMEs [35]. Además, se ha mostrado que durante los procesos de diferenciación las isoformas de NOS y subunidades de sGC se expresan dinámicamente. Las CME no diferenciadas no expresan la enzima sGC activa, pero conforme progresa la diferenciación se incrementan los niveles del ARNm y de la proteína de las subunidades $\alpha 1/\beta 1$ de sGC, coincidiendo con un aumento de los niveles de AMPc intracelular inducible por NO [36, 37]. Adicionalmente, los componentes de la vía de señalización del NO han sido implicados en la diferenciación de CMEs humanas hacia células neurales [38].

Se han descrito diversas evidencias que muestran que el NO/GMPc tiene un efecto pro-diferenciación a través de una interacción con otras vías de señalización. Un ejemplo es su interacción con la vía inducida por el ácido retinoico para promover efectos positivos sobre la diferenciación de CMEs humanas hacia progenitores neurales. [38]. Otro ejemplo es la diferenciación hacia cardiomiocitos inducida por oxitocina, que involucra la regulación positiva del ARNm de eNOS así como la actividad de iNOS y GCs dependiente de NO [39].

Es importante mencionar que estos efectos del NO sobre la diferenciación en CMEs han sido estudiados utilizando altas concentraciones de donadores de NO. Los resultados que forman parte de esta tesis son los primeros ejemplos que se encuentran en la literatura, que se han obtenido utilizando bajas concentraciones de

donadores de NO o con células transgénicas que producen endógenamente niveles fisiológicos de NO. En concreto nuestro grupo ha mostrado que el NO produce la activación de c-Src y Akt, independiente de la vía LIF/Stat3 como parte de una respuesta que impide la pérdida de las características de autorrenovación y pluripotencia de las CMEs, [40].

I.11 Efectos del óxido nítrico dependiente de dosis.

Los efectos del óxido nítrico sobre la biología de las células son duales y dependen de su concentración, siendo por lo general antagonicos a bajas y altas concentraciones. Como se ha mencionado antes, la activación de la NOS y de las isoformas de GCs durante el desarrollo temprano del embrión producen dosis variables de NO que pueden promover la proliferación celular, movimiento celular o diferenciación celular. La explicación de esta diversidad de efectos tiene relación directa con la química de las reacciones que el NO puede promover en las células. Se pueden definir, efectos directos y efectos indirectos, los efectos directos son aquellas reacciones químicas que ocurren lo suficientemente rápido para permitir que el NO reaccione directamente con una molécula biológica y los efectos indirectos están relacionados con la química de las especies reactivas de nitrógeno [22] [22] y especies reactivas de oxígeno (ERO) [41].

Las reacciones dependientes de la concentración despliegan diferentes reacciones que implican modificaciones post-traduccionales sobre algunas proteínas tales como: fosforilación, acetilación,

ubiquitinación, nitración y nitrosilación. Los eventos de nitración pueden ser llevados a cabo cuando las ERN producen altas concentraciones de NO que reacciona con el O₂ para formar peroxinitrito (ONOO⁻) y es este el que reacciona con el OH de los aminoácidos, principalmente la tirosina. La nitrosilación es la unión del NO en el grupo tiol de una cisteína y, la des-nitrosilación es la remoción de un grupo NO de un péptido o una proteína. La nitrosilación de cisteínas críticas (S-nitrosilación) no es enzimática y regula la función proteica, permitiendo a las células modificar dinámicamente la señalización en respuesta a estímulos fisiológicos [42]. Las bajas concentraciones de NO pueden modificar la función de las proteínas a través de la S-nitrosilación. Así, algunas funciones celulares relevantes han sido encontradas reguladas a través de la S-nitrosilación, por ejemplo la nitrosilación de Caspasa 3 juega un papel importante en la regulación de la función de las caspasas mitocondriales y ha sido implicada en la trans-nitrosilación de Xiap inhibiendo consecuentemente la actividad apoptótica [43]. Asimismo, la nitrosilación de la histona deacetilasa 2 (HDAC2) resulta en cambios en las modificación de histonas y en la activación génica durante la neurogénesis [44]. Hasta el momento no se han reportado eventos relacionados con la nitración de proteínas en modelos de CMEs. Estos mecanismos post-traduccionales relacionados con la dependencia de la concentración de NO podrían ser críticas para el balance entre autorrenovación y diferenciación de células madre embrionarias.

La regulación de la producción de NO *in vivo* provoca un incremento en el número de las células madre y en células progenitoras en la medula ósea. Además la movilización de las células madre de

medula ósea podría estar regulada por eNOS, así mismo eNOS podría ser importante para la actividad de hemangioblasto en células madre adultas [36]. Las células madre embrionarias de ratón y humanas en estado no diferenciado expresan NOS y algunos componentes de la vía de señalización del NO, indicando por lo tanto una concentración endógena de NO con función desconocida hasta la fecha.

Las CMEs no diferenciadas expresan altos niveles de eNOS. Luego durante la diferenciación en cultivos adheridos o en suspensión en gota colgante, los niveles de eNOS disminuyeron mientras que los niveles de iNOS, nNOS, sGC α 1, sGC β 1, y proteína quinasa dependiente de GMP cíclico (PKG) se incrementaron significativamente [45]. Esto sugiere que aunque la actividad del NO mediada por GMPc podría no ser funcional en las CMEs no diferenciadas, los componentes clave son diferencialmente expresados durante los eventos tempranos de diferenciación [46]. Interesantemente, en protocolos de diferenciación de cuerpos embrionarios en gota colgante expuestos a concentraciones hasta 100 μ M de donadores de NO, una variación en la expresión génica de los componentes de la vía de señalización NO-GCs fue observada, así como también la regulación positiva del marcador cardíaco Nkx2.5 [36, 46].

En este sentido, se han descrito otros protocolos de diferenciación que utilizan altas concentraciones de NO, teniendo en consideración sus efectos apoptóticos. En nuestro laboratorio utilizando concentraciones entre 0,5 mM a 1 mM de donadores de NO durante 19 horas, se promueve la represión de Nanog y Oct4. Este tratamiento además produjo un incremento en la tri-metilación de histona H3 en su

lisina 9 (H3K9me3), así como un incremento en la expresión génica de marcadores de endodermo tales como: FoxA2, Gata4, Hnf1- β y Sox17 [47]. Otra propuesta sobre el uso de altas concentraciones de NO es la reportada por Spallota y cols. Esta consiste en el cultivo de CMEs de ratón, primero en un medio suplementado con LIF y baja concentración de suero, y luego cambiando a medio sin LIF conteniendo 500 μ M de DETA/NO, obteniéndose un incremento notable de marcadores de mesodermo, incluyendo marcadores de células vasculares y musculares tales como: Flk1, SM22 α y Desmina, que fueron detectados 20 horas después del tratamiento con el mismo donador. Además, detectaron una fuerte actividad de deacetilasa en extractos nucleares de las CMEs después de 1 y 3 horas de tratamiento [48].

I.12 Diferenciación de células madre embrionarias inducida por el óxido nítrico.

Aunque el uso de CMEs para generar células apropiadas para terapias de reemplazamiento de tejidos ha ganado interés en los últimos años, aun es necesario el diseño de métodos precisos para la obtención de estas células. Estudios orientados a comprender el comportamiento de las CMEs en el contexto de otros modelos celulares, como en las iPSs será requerido para desarrollar mejores protocolos de diferenciación y más eficientes para su uso en medicina regenerativa y terapia celular dirigida a paciente. En este sentido el descubrimiento de “pequeñas moléculas” nuevas y la descripción de su modo de acción sobre vías de señalización celular específicas involucradas en

desarrollo embrionario pueden ofrecer valiosa información con respecto a su papel en desarrollo y diferenciación celular.

Como se ha descrito anteriormente, el NO es una molécula que tiene efectos diferentes dependiendo de su concentración. El NO actúa como un segundo mensajero para regular los procesos importantes como el crecimiento, la supervivencia, proliferación, migración, guía de axones, la diferenciación y otros procesos a través de una variedad de cascadas de señalización corriente abajo lo que ha dado lugar al desarrollo de diversos protocolos para mejorar la diferenciación de células madre embrionarias hacia linajes celulares definidos. En la figura 4 se resumen tres estrategias de diferenciación desarrolladas usando NO como agente diferenciador.

I.13 Diferenciación de las CMEs inducida por óxido nítrico hacia cardiomiocitos y tejidos vasculares.

La diferenciación de CMEs de ratón hacia cardiomiocitos inducida por el NO publicado por Kanno en el año 2004 fue el primer protocolo de diferenciación usando esta molécula que se reporta en la literatura. El artículo muestra que 200 μ M de S-nitroso-N-acetilpenicilamina (SNAP) incrementa el porcentaje de 15 a 45 % de cuerpos pulsátiles derivados de cuerpos embrionarios con respecto a la diferenciación espontánea durante 14 días por falta de LIF. Asimismo, el inhibidor de NOS L-nitro-arginina-metil éster (L-NAME) disminuyó la incidencia de los cuerpos pulsátiles en comparación con las células control. La sobreexpresión de iNOS aumentó en 6 veces en el número

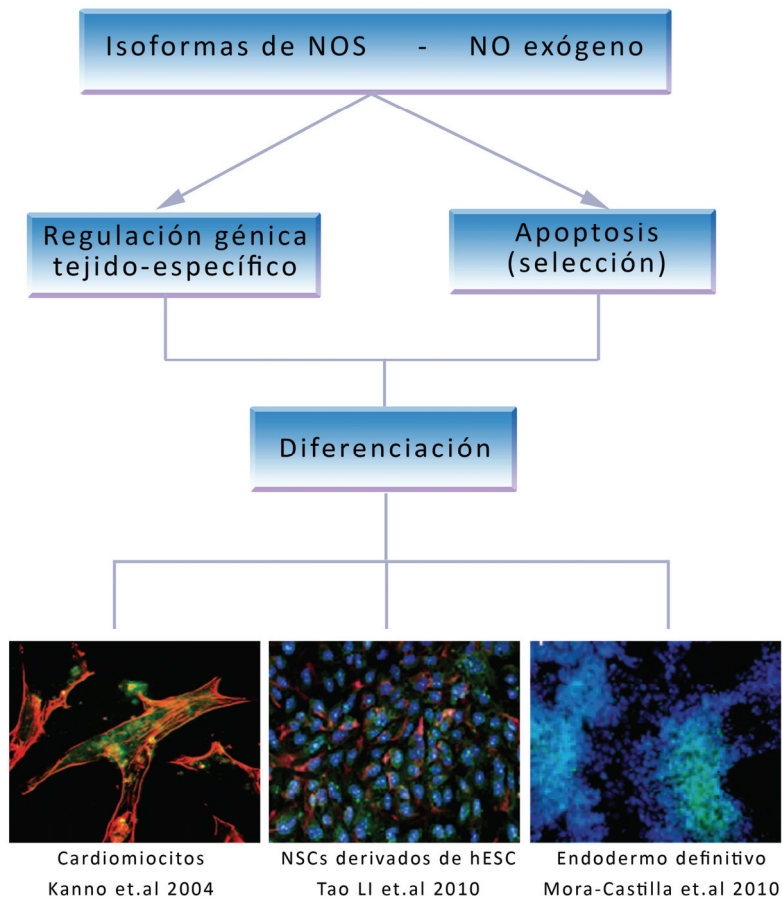


Figura 4. Diferenciación a partir de CMEs usando óxido nítrico hacia las tres capas germinales. El tratamiento de las células con altas concentraciones de NO exógeno, así como NO producido por las isoformas de NOS (principalmente iNOS y nNOS) activan diversos programas celulares. La maquinaria apoptótica puede seleccionar entre células comprometidas o no hacia un fenotipo determinado. Simultáneamente se activa una red transcripcional de programas tejido-específico que indicará el destino o compromiso de las células. Estos dos mecanismos combinados pueden generar estrategias de selección eficientes para protocolos de diferenciación. Modificado de la referencia [49].

de células positivas a troponina T (un marcador de cardiomiocitos). Estos resultados muestran que altas concentraciones de NO producido en forma endógena o suministrado exógenamente promueve la diferenciación de las CMEs. Posteriormente entonces otros grupos han mostrado el papel del NO y de los componentes de la vía señalización

del GMPc en el desarrollo cardíaco, así como ciertas moléculas que podrían regular la cardiomiogénesis temprana en células madre embrionarias a través de vías dependientes de NO [46, 50, 51].

I.14 Diferenciación de la CMEs hacia tejido neuronal inducida por óxido nítrico.

La participación del NO en la formación del sistema nervioso es probable que se encuentre relacionada con su papel en la muerte celular programada de la neurona, la organización de patrones de proyección axonal, o con el control de la proliferación celular. En líneas celulares neuronales, las isoformas nNOS e iNOS son inducidas por agentes diferenciadores, y en algunos casos la acción anti-proliferativa del NO puede ser un pre-requisito para la diferenciación. [52]. A pesar de la evidencia acumulada sobre el papel que cumple el NO en la diferenciación neuronal, todavía hay un controvertido debate acerca de cual de las isoformas de la NOS es responsable de la síntesis de NO durante las primeras etapas de diferenciación neuronal. Las evidencias apuntan hacia una expresión preferencial de iNOS durante estadios embrionarios tempranos y su presunto papel durante los pasos subsiguientes en la diferenciación neuronal.

Recientemente el grupo de Ferid Murad en Texas, EE.UU ha publicado un nuevo enfoque para la diferenciación de las CMEs humanas hacia células neuronales. La diferenciación espontánea de CMEs humanas en medio de diferenciación conduce a la co-expresión de Nestina y nNOS, pero el análisis FACS demostró un aumento

adicional en células positivas para nNOS después del tratamiento con ácido retinoico y 8-bromo-GMPc (10^{-5} M). Estos resultados sugieren que la vía de señalización NO/GMPc contribuye a la diferenciación de precursores neurales a partir de CMEs de humanas y aumenta la diferenciación de precursores hacia neuronas funcionales [38].

I.15 Participación del óxido nítrico en la diferenciación de CMEs hacia endodermo.

Se conoce muy poco el papel del NO en la diferenciación hacia linaje endodérmico, nuestro grupo ha mostrado que el NO conjuntamente con el ácido valproico promueven la diferenciación de células madre embrionarias hacia endodermo definitivo. Se plantea dos mecanismos conjuntos de su acción, por un lado la generación de especies RN y RO como resultado del tratamiento con NO podría activar la apoptosis, lo cual podría ser utilizado como una estrategia de selección de poblaciones de células comprometidas a diferenciarse que serían resistentes a la apoptosis; por otro lado el NO directamente podría regular negativamente o positivamente la expresión de genes de pluripotencia o diferenciación, como son los casos de Nanog y Pdx-1 respectivamente. [47].

Adicionalmente, se ha descrito que el NO es un mediador en la diferenciación de CMEs hacia tejidos hematopoyéticos inducida por el estrés por agitación [53].

I.16 El óxido nítrico y la regulación de la expresión génica en células madre embrionarias.

Como se ha descrito en secciones anteriores, un conjunto básico de factores de transcripción trabajan juntos para mantener el estado pluripotente de los CMEs. Estos reguladores transcripcionales, que incluyen a Oct4, Sox2, y Nanog, estimulan la expresión de los genes que controlan la auto-renovación, mientras que reprimen a los genes que promueven la diferenciación.

Las CMEs presentan altos niveles de histona H3 acetilada en su residuo de lisina 9 (H3K9Ac) y H3K4me3; estos marcadores de la cromatina abierta también se combinan con la H3K27 en algunos genes no expresados. Por lo tanto, la pluripotencia en las CMEs se caracteriza por un perfil epigenético específico donde los genes linaje específico podrían mostrarse accesibles, pero llevan modificaciones represivas como la H3K27 me3. La metilación en H3K27 es funcionalmente importante para prevenir la expresión de estos genes en CMEs [21].

En los últimos años se han publicado una cantidad sustancial de información acerca de los efectos de la transcripción por parte del NO en diferentes tipos celulares y tejidos. El NO puede modular la expresión génica a través de diferentes mecanismos: i) Regulando directamente la actividad de múltiples factores de transcripción por S-nitrosilación y/o nitración, como en el caso de CREB, NF κ B, y nMYC; ii) Promoviendo modificaciones post traduccionales indirectas de reguladores transcripcionales, como la modificación de estado de

fosforilación, iii) Promoviendo cambios en la estructura de la cromatina, a través de metilación y acetilación de histonas iv) Alterando el grado de metilación de ADN en sitios CpG, a través del control de la actividad de las metilasas y desmetilasas de ADN [54].

La S-nitrosilación media la regulación dependiente de NO de varios factores de transcripción que contienen dominios dedos de zinc (*Zn fingers*), incluyendo Egr1 y NFkB. La S-nitrosilación de grupos zinc-azufre de estos FTs interrumpe la unión del zinc, inhibiendo su asociación con el ADN. Otros estudios han sugerido que vías de señalización reguladas por el NO pueden inhibir la unión de AP1 al ADN a través de la modificación de sus dos componentes, c-fos y c-jun [55].

El tratamiento con altas concentraciones de donadores de NO puede inhibir la expresión de Oct4 y Nanog en CMEs, aumentar la actividad de transactivación de p53, remodelar la cromatina y promover la expresión de los genes de endodermo temprano Pdx1 y Gata4. La actividad supresora del NO sobre el gen de Nanog depende de la activación de la proteína represora p53. La represión de la maquinaria de auto-renovación activa un programa de diferenciación que estimula la expresión de factores de transcripción como Brachyury, Gata4, Pdx1 y Foxa2. La inactivación de p53 inhibe significativamente el efecto del NO. [47].

Recientemente, la enzima modificadora de cromatina, HDAC2, ha sido identificada como una diana nuclear clave del NO. La S-nitrosilación de HDAC2 se produce en dos residuos de cisteína, Cys262

y Cys274, y no afecta su actividad deacetilasa en las neuronas. En su lugar, la S-nitrosilación de HDAC2 induce su disociación de promotores de genes regulados por CREB [55]. El NO puede promover la diferenciación de CMEs de ratón en presencia o ausencia de LIF, por su capacidad para inducir la expresión de marcadores mesodérmicos. Sin embargo, es sólo a partir de la retirada de LIF que el NO activa HDACs de clase IIa; y los genes mesodermales son fuertemente expresados. Estos eventos están asociados con cambios dependientes de NO en los dominios de cromatina específicos para promotores de genes mesodérmicos. La capacidad del NO de inducir genes mesodermales en presencia de LIF puede deberse a su capacidad para regular otros componentes de la maquinaria de remodelación de la cromatina [48].

Estudios adicionales sobre la regulación génica inducida por el NO en células madre embrionarias son necesarios para diseñar y mejorar protocolos de inducción de la diferenciación hacia tipos celulares específicos. Asimismo, es importante esclarecer el efecto del NO sobre la modulación de la expresión génica en las CMEs, tanto a altas como a bajas concentraciones considerando su efecto dual intrínseco. En ese contexto realizar análisis transcripcionales o de regulación a nivel genómico podrían generar una serie de informaciones valiosas sobre los efectos del óxido nítrico en la modulación de las funciones celulares en CMEs. Adicionalmente ayudarían a dilucidar el impacto de los tratamientos con diferentes concentraciones de NO sobre las CMEs y como afectan la función de proteínas importantes como ciertos factores de transcripción, y sus efectos posteriores sobre la regulación de genes específicos de linaje y

su papel en la diferenciación o en el mantenimiento de la autorrenovación y la pluripotencia.

I.17 Otras funciones celulares afectadas por el óxido nítrico sobre las células madre embrionarias.

El mantenimiento del estado indiferenciado de una población de CMEs requiere el mantenimiento de la auto-renovación, inhibición de la diferenciación y regulación de la proliferación. Las CMEs carecen del punto de control G1/S del ciclo celular o de un paso de senescencia celular en respuesta a daño en el ADN. Estas células proliferan sin límite aparente y pueden ser propagadas clonalmente. Por lo tanto, es crucial para las CMEs contener mecanismos estrictos para mantener la estabilidad genética durante la autorrenovación. La tasa de mutaciones espontáneas en las CMEs es significativamente menor que en las células somáticas. La acumulación de ADN dañado no reparado en las CMEs podría no sólo promover la tumorigénesis en múltiples linajes celulares, sino que también estas mutaciones podrían pasar a la descendencia, conduciendo a la inestabilidad genética en las células diferenciadas [56, 57].

Como se mencionó anteriormente, el NO puede producir diversos efectos dependiendo de su concentración y disponibilidad. Una sobreproducción de larga duración de NO actúa como un mediador pro-apoptótico mediante la activación de proteasas de la familia de las caspasas después de la liberación de citocromo c de las mitocondrias en el citosol [58, 59], regulación positiva de la expresión de p53, y

finalmente, la regulación de la expresión de proteínas asociadas a apoptosis, incluyendo proteínas de la familia Bcl. Sin embargo, concentraciones bajas o fisiológicas de NO protegen a las células de la apoptosis inducida por la retirada de factores tróficos como: Fas, TNF α /ActD, y LPS. Este mecanismo anti-apoptótico es mediado por la transcripción de genes protectores incluyendo las proteínas de choque térmico, hemoxigenasa y ciclooxigenasa-2, así como la inhibición directa de los efectores ejecutores de la apoptosis, las proteasas de la familia de caspasas, a través de S-nitrosilación de su sitio catalítico [60].

El uso potencial de óxido nítrico como una molécula de selección en los protocolos de diferenciación es sostenido por la capacidad del NO para influir en diferenciación cardíaca, tanto por inducción de la señalización hacia un fenotipo cardíaco como por la inducción de apoptosis en las células no comprometidas hacia la diferenciación cardíaca [30]. En nuestro modelo de diferenciación de CMEs dirigido hacia células endodérmicas, la exposición a altos niveles de donadores químicos de NO desencadena también eventos apoptóticos. De hecho, 30-40% de las células son positivas para anexina V. Otros marcadores de apoptosis, como la degradación de PARP y caspasa 3 activada, están presentes también en estas células. Estos signos de apoptosis están acompañados por un aumento en los niveles de proteína p53. La fosforilación de p53 en Ser 15 y Ser 392 se ha reportado ser inducida por estrés oxidativo y participa en la apoptosis dependiente de p53. En las células que permanecen adherentes después del tratamiento con NO, p53^{pSer315, pSer392} se encuentra mayormente en el núcleo donde se comporta como un

represor de la Nanog [47]. Es importante destacar que Bcl2 y proteínas afines, las cuales han sido reportadas como reguladores importantes de la apoptosis han sido asociadas también como reguladores de autorrenovación en células madre embrionarias [61].

=====Hipótesis y Objetivos

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Actualmente los métodos de cultivo de CMEs en condiciones que favorecen la autorrenovación, no son suficientes para detener la diferenciación espontánea y no evitan la proliferación de cultivos heterogéneos, disminuyendo la capacidad y eficiencia de estas células como material de inicio para posibles terapias de regeneración de tejidos. En esta tesis, proponemos que el Óxido Nítrico es un reactivo que puede ser una alternativa. En ese sentido planteamos como hipótesis que la suplementación con bajas concentraciones de óxido nítrico en el cultivo de CMEs, ayudan a mantener la autorrenovación y la pluripotencia y retrasan la entrada en la diferenciación, a través de la regulación de la expresión génica.

Para demostrar esta hipótesis se plantean los siguientes objetivos.

II.1 Objetivo general:

Determinar el efecto de las bajas concentraciones de óxido nítrico sobre la regulación de la expresión génica en los procesos relacionados con la pluripotencia, la diferenciación, apoptosis y remodelación de la cromatina en células madre embrionarias murinas y humanas.

II.2 Objetivos específicos:

II.2.1 Caracterizar las líneas celulares de las CMEs de ratón y CME humanas, tomando en consideración los siguientes aspectos:

II.2.1.1 Dinámica de la expresión de las isoformas de NOS.

II.2.1.2 Actividad fosfatasa alcalina.

II.2.1.3 Actividad telomerasa.

II.2.1.4 Estudio cuantitativo de la expresión de marcadores de pluripotencia mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qRealTime-PCR) y western blot.

II.2.1.5 Cuantificación de la expresión de eGFP por citometría de flujo y microscopía de fluorescencia.

II.2.2 Determinar el efecto de las diferentes concentraciones de NO exógeno sobre los cambios en la expresión de marcadores de pluripotencia y diferenciación a través de la cuantificación por citometría de flujo y PCR en tiempo real. Determinar una concentración de NO óptima para el cultivo de CMEs en estado no diferenciado en ausencia de factores como LIF o bFGF.

II.2.3 Realizar un estudio a nivel genómico del efecto del NO sobre la expresión génica en CMEs cultivadas en condiciones de diferenciación, usando la tecnología de los *microarrays* de cDNAs. Determinar las vías de señalización así como las redes de interacción molecular que podrían estar reguladas por el tratamiento con NO.

II.2.4 Determinar el efecto del NO sobre la proliferación y el control del ciclo celular, a través de la exploración de la expresión de genes responsables del control del ciclo celular y proliferación.

Así como el efecto del NO sobre las diferentes fases del ciclo celular.

II.2.5 Explorar el efecto del NO sobre las vías de señalización de la apoptosis y los sistemas de muerte celular en condiciones de cultivo que favorecen la diferenciación (medio sin LIF). Determinar la activación de las caspasas, así como la regulación de la expresión de genes involucrados en muerte celular y apoptosis.

II.2.6 Explorar el efecto del NO sobre la maquinaria transcripcional que regula a nivel epigenético los procesos de diferenciación ciclo celular y apoptosis. Determinar el efecto sobre la expresión de genes de remodelación de cromatina, metilación de ADN y de factores de transcripción y complejos reguladores involucrados en la expresión de genes diana. Adicionalmente, estudiar el papel del óxido nítrico sobre la localización de histonas modificadas y su relación con la expresión génica.

_____ *Materiales y Métodos*

III. Materiales y Métodos

III.1 Líneas de Células Madre Embrionarias utilizadas.

Se utilizaron en cultivo la línea de CME de ratón comerciales **D3** (ATCC: CRL1934) generadas por el grupo de T. Doetschman (PubMed: 3897439) a partir de un blastocisto de la línea de ratón 129/Sv+c/+p (RF32835) y **R1/E** (ATCC: SCRC1036) y una línea de CME de origen humano **Hs181**, generadas por *O. Hovatta* y cedida por el Instituto Karolinska. La línea D3 sirvió para generar el clon D3-Oct4-GFP mediante la transfección de la con el plásmido pOct4-eGFP. Este constructo posee el promotor humano del gen Oct4 ([POU5F1](#), GeneID: 18999) seguido de la secuencia codificante de la proteína eGFP (*enhanced GFP*) (plásmido pEGFP-1, Cat. # 6086-1; U55761; CLONTECH Mountain Blue, CA, USA). De esta forma, el promotor del gen Oct4 controla la expresión de la proteína fluorescente GFP. Esta línea de células embrionarias expresan el marcador verde fluorescente cuando expresan el gen Oct4, es decir, cuando permanecen en su estado indiferenciado, constituyendo un buen modelo para visualizar y cuantificar las células que expresan el gen Oct4. El protocolo de transfección ha sido descrito previamente en [47]

III.2 Cultivos celulares.

Las líneas celulares de ratón fueron cultivadas a baja densidad, 10^5 células para frascos de cultivo celular de Rous de 75 cm^2 , utilizando medio modificado Eagle de Dulbecco (DMEM) (Gibco Life Technologies, Paisley, UK) suplementado con 15% de suero bovino fetal (FBS) (Hyclone, **HyClone and TC Tech products, South Logan, UT, USA**), 1 % de amino ácidos no-esenciales, 0.1 mM de 2-

mercaptoetanol, 4 mM de L-glutamina, 1 mM piruvato de sodio, 1000 IU/ml penicilina y 0.1 mg/ml estreptomicina. La incubación se llevo a cabo a 37°C y 5 % CO₂. El estado indiferenciado de las CMEs fue mantenido adicionando 1000 U/ml de rLIF (factor inhibidor de leucemia recombinante) (Gibco) al medio de cultivo. Para todos los tratamientos las células fueron cultivadas durante 6 días excepto cuando se mencione el tiempo. El tratamiento consistió en agregar el donador de NO DETA-NO (aducto de diethylenetriamine/NO) (Sigma Aldrich St. Louis, MO, USA) a las células cultivadas en ausencia de LIF, se realizaron experimentos de dosis efecto a concentraciones que varían desde 2 µM hasta 50 µM o solo 2 µM según sea el caso, después de la optimización del estudio de dosis efecto. El medio fue reemplazado cada 19 horas, considerando el tiempo de vida media del donador. Las CMEs humanas línea H181 fueron cultivadas en adherencia en placas de cultivo de tejidos cubiertas con Matrigel (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) en medio modificado Eagle de Dulbecco/KO suplementado con 20% de suero de reemplazamiento knock-out (Gibco Invitrogen Corporation) 2mM de L-glutamina (Gibco Invitrogen Corporation), 0.1 mM de 2-mercaptoetanol (Gibco Invitrogen Corporation), 1 % de amino ácidos no-esenciales (Gibco Invitrogen Corporation) y 100 U/ml por 100mg/ml de penicilina/estreptomicina (Gibco Invitrogen Corporation). El estado no diferenciado se mantuvo agregando 8 ng/ml bFGF (factor de crecimiento de fibroblastos básico). Para el tratamiento se realizo de la misma manera que para las CMEs de ratón. Las células fueron sub-cultivadas cada 6 días por tripsinización suave, agregando tripsina al 0.5 % pre-calentada a 37°C, e incubada a 37°C durante 3 minutos. Centrifugada a 1000 rpm durante 5 minutos.

III.3 Aislamiento de ARN total.

El ARN total de tres pases subsecuentes (p32- 34 para CMEs de ratón y p72-74 para CMEs humanas) fue aislado para realizar el análisis de expresión en *microarrays* y PCR cuantitativa en tiempo real, usando el reactivo Easy Blue® (Intron Biotechnology, Kyungki-Do, Korea), seguido por precipitación en iso-propanol y lavados con etanol al 75%. El ARN fue resuspendido en agua libre de nucleasas y conservado a -20°C hasta su uso para síntesis de RNA complementario (RNAc) o DNA complementario (DNAc). La pureza del ARN total fue evaluado midiendo la absorbancia de cada muestra a 260 y 280 nm determinando así concentración y pureza usando un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Nanodrop Willmington, DE). La integridad de las muestras de ARN total fue evaluado cualitativamente en un Bioanalizador Agilent 2100® (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

III. 4 Transcripción reversa y PCR cuantitativa en tiempo real.

Para la transcripción reversa 1 µg de ARN total con 5 U/µL de la transcriptasa reversa M-MLV (Promega, Madison, WI, USA) y 12.5 µg/µL de cebadores aleatorios (Promega) fueron mezclados en un volumen de 25 µL e incubados durante 1 h a 37°C. El ADN complementario (ADNc) obtenido fue diluido 1:10 y usado como molde para la PCR cuantitativa en tiempo real usando el reactivo SYBR GREEN PCR Master mix® (Applied Biosystems Carlsbad, CA, USA). Para cada 20 µL de reacción, la mezcla contenía: 10 µL de 2X SYBR Green master mix®, 0.2 µM de oligonucleótidos específicos, 1 µL de ADNc diluido y agua hasta un volumen final 20 µL de reacción. La reacción de PCR cuantitativa en tiempo real fue realizada en un

termociclador 7500 Real Time PCR system® (Applied Biosystems) con los siguientes parámetros de amplificación: 95° durante 10 min., 95 durante 30 seg., 60 durante 1 min., durante 40 ciclos. La adquisición de los datos fue a 60°C y fueron analizados con el programa de la propia casa comercial 7500® v 2.01. Todas las muestras fueron normalizadas con respecto a la expresión del control endógeno β -actina, y todos los datos fueron analizados usando el método $\Delta\Delta C_T$ [62]. En la Tabla 10 se presenta una lista de los oligonucleótidos utilizados para la PCR cuantitativa (Anexo 9).

III. 5 Preparación del ARN complementario (ARNc) y del microarray de ADNc.

Los estudios transcriptómicos fueron realizados utilizando los *microarrays* de Mouse Genome 430_2.0 con 45000 sondas y Human Genome U133 Plus 2.0 Array con 54000 sondas, ambos de Affymetrix (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). ARNc biotinilado fue preparado a partir de 1.5 μ g de ARN total, de acuerdo al protocolo estándar propuesto por Affymetrix (Expression Analysis Technical Manual, 2004, Affymetrix). Los productos de reacción purificados fueron fragmentados a 94°C por 35 min. para obtener fragmentos entre 35 y 200 pb. A continuación de la fragmentación 15 μ g de ARNc fueron hibridados por 16 h a 45°C al *microarray* GeneChips®. Los *microarrays* fueron lavados y teñidos en la estación Affymetrix Fluidics Station FS450® de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Los *microarrays* fueron escaneados usando el Affymetrix GeneChip® Scanner 3000 7G. Todos los ensayos en *microarrays*

fueron realizados y procesados en colaboración con la Unidad de Genómica del CABIMER.

III.6 Análisis de expresión génica a partir de los datos de los microarrays.

El calculo de la intensidad de la señal de los datos crudos fueron analizados con el Microarray Suite versión 5.0 (MAS 5.0) usando los parámetros por defecto del GeneChip Operating System v. 1.4.0.036. El método de normalización usado fue el de promedio robusto de múltiples matrices (*Robust Multi-array Average (RMA)*). Los valores de expresión de los tres pases de células tratadas con NO fueron comparados con respecto a aquellos cultivados en ausencia de LIF. La diferencia en los valores de las señales de cada sonda de las respectivas muestras, fueron expresadas como expresión diferencial reportada como el ratio Log2. De esta manera los genes fueron considerados regulados positivamente o negativamente si el ratio Log2 de la expresión normalizada en las tres replicas está sobre 0.26 o bajo -0.26, respectivamente. Los genes fueron considerados estadísticamente significativos si el valor P de la prueba de Fisher es inferior a 0.05 ($p < 0.05$).

Los genes filtrados por el valor $p < 0.05$ fueron usados para generar mapas de calor (*heat maps*) y agrupamientos por jerarquía, usando el programa MultiExperiment Viewer 4.1 (The Institute for Genomic Research, Dana Farber Cancer Institute, Boston, MA, USA). Estos diagramas nos permiten ver como se agrupan los genes de acuerdo a sus niveles de expresión y a su vez su comportamiento con nuestros tratamientos. La herramienta Ingenuity Pathway Analysis® (Ingenuity Systems, <http://ingenuity.com>) fue usada para generar redes de

interacción y vías de señalización a partir del análisis de anotación funcional. Para usar esta herramienta los códigos de identificación de Affymetrix, los niveles de cambio de cada sonda en su respectivo tratamiento y el valor p fueron importados en la plataforma IPA 5.0. Con estos datos el programa genera una lista de categorías basadas en funciones moleculares. Las redes de interacción y vías de señalización generadas son clasificadas de acuerdo a una puntuación. Esta puntuación está en función de la probabilidad que un grupo de genes igual o mayor al número de ellos en una vía/red podría aparecer por azar. Por ejemplo: una puntuación de 3 indica que existe una probabilidad de 1/1000 de que los genes centrales están en una red debido al azar. La significancia calculada para cada función obtenida del análisis funcional es una medida de la verosimilitud de que una función determinada este asociada con el conjunto de nuestros datos por azar. La prueba exacta de Fisher fue usada para calcular los valores p para el análisis funcional y la generación de vías de señalización canónicas y redes de interacción en IPA (Ingenuity® Systems, Redwood City, CA, USA www.ingenuity.com).

El conjunto de datos de cada experimento de los *microarrays* han sido depositados en la base de datos depositaria de experimentos de expresión a nivel genómica *Gene Expression Omnibus* [18], del Centro Nacional de Biotecnología del Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos siguiendo las recomendaciones establecidas en el protocolo MIAME (*Minimum Information About a Microarray Experiment*) por la Sociedad de datos de Genómica funcional (*The Functional Genomics Data Society FGED*). Números de Acceso: Para CMEs de ratón: GSE13235 y para CMEs humanas: GSE36609.

III.7 Ensayo de Fosfatasa alcalina.

Las CMEs de ratón fueron cultivadas a una densidad de 3×10^3 células en placas de 60mm durante cinco días y luego fijadas con 4% de paraformaldehído durante 2 min. a temperatura ambiente. La tinción para fosfatasa alcalina fue realizada usando el kit de sustrato para fosfatasa alcalina SIGMA FAST[®] (SIGMA) siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

III.8 Microscopía de fluorescencia.

Un total 2×10^3 células fueron cultivadas sobre laminas de vidrio de 15 mm contenidas en el interior de placas de cultivo de 12 pocillos, o directamente en placas de 4 pocillos. Las células fueron fijadas con metanol helado por 5 minutos, bloqueadas con solución de bloqueo (2 % de albúmina de suero bovino, 2 % de suero de burro, 2 % de suero de cabra en PBS) durante 30 minutos. La reacción con el anticuerpo primario específico se llevo a cabo toda la noche. La detección del anticuerpo primario se realizó usando los anticuerpos secundarios específicos para el isotipo del anticuerpo primario. La lista de los anticuerpos primarios y secundarios se muestra en la Tabla 11 (Anexo 10). Los núcleos de las células fueron marcados con 300 nM de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), un marcador fluorescente que se intercala en las regiones ricas en A-T en el ADN. Las imágenes fluorescentes fueron obtenidas usando un microscopio Leica DM 5500 (Leica Microsystems, Wetzlar Germany). Finalmente las imágenes fueron procesadas usando el programa Adobe Photoshop (Adobe Systems Incorporated, San Jose, CA, USA).

III.9 Análisis de inmunodetección.

Las células fueron recogidas por centrifugación a 1000 rpm por 5 min., y los precipitados lavados con PBS 1X y resuspendidos en 150 μ L de tampón para ensayos de radio-inmuno-precipitación (buffer RIPA) (SIGMA) suplementado con inhibidores de proteasas. La ruptura celular se llevo a cabo, incubando en hielo durante 45 minutos, y con agitación durante 30 segundos en un vortex cada 15 minutos. Luego un paso de sonicación que consistió de cuatro pulsos de 10 segundos a una amplitud de 10% en un sonicador Ultrasonicater (Branson Digital Sonifier, Branson Ultrasonics Corporation, Danbury, CT, USA). Los análisis de inmunoblots a través de la técnica de Western blot fueron realizados usando protocolos estandarizados en el laboratorio. De 20 a 50 μ g de proteínas totales fueron cargadas en geles de poliacrilamida de porcentajes determinados considerando el peso molecular de la proteína analizada. Los anticuerpos tanto primarios como secundarios usados en los ensayos están listados en la Tabla 11 Anexo 10. Las bandas inmunoreactivas fueron detectadas por quimioluminiscencia.

III.10 Ensayos de Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP).

Las células cultivadas de acuerdo a las condiciones experimentales fueron recuperadas por tripsinización suave. Las uniones ADN-proteína fueron fijadas rápidamente en formaldehído al 1% (w/v) durante 10 minutos a 37°C. Las células recogidas fueron resuspendidas en buffer de lisis 150mM NaCl, 50mM Tris-HCl (7,5), 5mM EDTA, 0,5% NP-40, 1% Triton, 0,1% SDS) e incubadas en hielo durante 1° minutos. La cromatina obtenida se sonicó mediante 5 pulsos de sonicación en buffer de lisis (durante 10 segundos con una amplitud

de 10% en un ultrasonificador (Branson 15 Digital Sonifier). Los extractos de cromatina conteniendo fragmentos de ADN con un tamaño promedio de 500 pb fueron inmunoprecipitados usando 2 μ g de anticuerpos por muestra, la lista de los anticuerpos utilizados son mostrados en la Tabla 11 Anexo 10. Anti-IgG de conejo (Abcam, Cambridge, UK; ab46540) fue usado como control para los experimentos de ChIP. Simultáneamente 40 μ L de esferas magnéticas Dynabeads® (Invitrogen, Dynal AS, Oslo, Norway) se usaron para preparar complejos de Anticuerpo-esferas e incubadas durante 1 hora a 4°C en rotación. Luego, la cromatina fue añadida e incubada durante 2 horas más a las mismas condiciones. Los inmunocomplejos con la cromatina fueron lavados: una vez con tampón bajo en sal (20 mM Tris-HCl pH8.1, 2 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1 % SDS, 150 mM NaCl); una vez con tampón alto en sal (20 mM Tris-HCl pH8.1, 2 mM EDTA, 1 % Triton X-100, 0.1 % SDS, 500mM NaCl); y una vez con tampón cloruro de litio (10 mM Tris-HCl pH8.1, 1 mM EDTA, 1% deoxicolato, 1 % NP40 (Igepal), 250 mM LiCl), seguidamente de dos lavados con tampón TE (10 mM Tris-HCl pH8.1, 1 mM EDTA). Finalmente, la cromatina fue resuspendida con 500 μ L de tampón de elución (1 % SDS, 0.1 M NaHCO₃). Para analizar y cuantificar la ocupación de las proteínas inmunoprecipitadas en las reacciones específicas de la cromatina se realizaron reacciones de PCR en tiempo real usando el reactivo verde Sybr (Roche, East Sussex, UK). El valor de ocupación fue determinado por el método de cuantificación de enriquecimiento. La lista de los oligonucleótidos usados se encuentra en la Tabla 10 (Anexo 9).

III.11 Ensayos de proliferación celular.

Los ensayos de proliferación celular se llevaron a cabo usando el reactivo fluoroforo 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU) para investigar los cambios en la síntesis de ADN, para esto se uso el kit Cell Proliferation ELISA BrdU (Roche). El protocolo detallado consiste en el cultivo de las células en la presencia y ausencia de LIF y células cultivadas en medio en ausencia de LIF y suplementado con 2 μ M DETA-NO durante 3 días. Luego 100 μ L de solución de marcaje fresca fue adicionada a cada pocillo durante 16 horas. Después de las 16 horas de incubación con BrdU, las células fueron fijadas y luego incubadas con anticuerpo anti-BrdU conjugado con peroxidasa. Después de la adición del sustrato, la densidad óptica fue determinada a 450 nm con una longitud de onda de referencia de 600 nm, la cual fue directamente proporcional a la cantidad de ADN sintetizado.

III.12 Sincronización y análisis del ciclo celular.

Para la liberación sincronizada desde el bloqueo en fase M, los cultivos de células D3-pOct4-GFP y R1 indiferenciadas fueron mantenidos durante 24 h después del pase. Luego las células fueron tratadas con 2.5 mM de timidina (Sigma) durante 12 h, lavadas dos veces con PBS pre-calentado e incubadas en 400 ng/mL de Nocodazol (Sigma) durante 6 h más. Estas células fueron lavadas dos veces con PBS pre-calentado y luego liberadas en medio pre-calentado en presencia de LIF, ausencia de LIF y ausencia de LIF más tratamiento con 2 μ M de DETA-NO. El contenido de ADN celular fue determinado a través de la tinción de las células con una solución conteniendo 200 μ g/ml de RNasa A y 20 μ g/ml yoduro de propidio. Las células fueron incubadas durante 15 min. a 37°C. La intensidad de la fluorescencia

fue determinada por citometría de flujo en un equipo Becton Dickinson FACScan. La adquisición de datos se realizó con el programa CellQuest (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ. USA).

III.13 Análisis de formación de teratomas.

CMEs humanas H181 y CMEs de ratón D3-Oct4 fueron cultivadas a una densidad de 1×10^5 y 1×10^4 células/ml, respectivamente en sus medios de cultivo, en ausencia de bFGF o LIF, suplementado con 2 μ M de DETA-NO. Ratones machos SCID-CB17 de seis semanas de edad (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME, USA) fueron inyectados por vía subcutánea sobre la región dorsal con 1×10^6 CMEs de ratón o 1×10^5 CMEs humanas en 100 μ L de suspensión celular. Seis semanas después de la inyección de las CMEs de ratón y de ocho semanas después para las CMEs humanas, tumores de 20 mm diámetro aproximadamente fueron extraídos quirúrgicamente de los ratones. Las muestras fueron pesadas, fijadas en PBS conteniendo 4% de formaldehído y posteriormente incluidas en parafina. Las secciones obtenidas después del corte con microtomo fueron teñidas con hematoxilina y eosina para su examen histológico.

III.14 Análisis estadístico.

Los datos representados son las medias más la representación de la desviación estándar de por lo menos tres experimentos independientes, excepto para los resultados de western blot, los cuales son una figura representativa de tres ensayos independientes. Las comparaciones de los valores entre tratamientos y controles fueron analizadas usando un análisis de varianza de una entrada (ANOVA), usando la prueba de Tukey. Un valor de $p \leq 0.05$ fue considerado como estadísticamente significativo.

Resultados

IV. Resultados

IV.1 Las células madre embrionarias de ratón producen niveles homeostáticos de óxido nítrico.

En los últimos años algunos estudios han mostrado evidencias que relacionan la producción del óxido nítrico y el desarrollo embrionario animal [27, 28], estos estudios muestran que las vías de señalización del NO participan en mecanismos que favorecen la diferenciación hacia diversas líneas germinales principalmente ectodérmicas; además estos mecanismos son independientes de su concentración y de la vía clásica NO/GC. En ese contexto nos propusimos investigar cual era el efecto de la producción de óxido nítrico, así como la dinámica de expresión de las isoformas de la NOS responsables de su producción en las CMEs.

El análisis de expresión génica de las isoformas de NOS en la línea celular D3-Oct4-GFP reveló que las células no diferenciadas cultivadas en presencia de LIF expresan en mayor cantidad la isoforma endotelial (eNOS), mientras que no se aprecia expresión de iNOS y los niveles para nNOS son ligeramente perceptibles (Figura 5A columna 1). La exposición de las células a condiciones de diferenciación debido a su cultivo en ausencia de LIF o a través de formación de cuerpos embrionarios promovió la disminución sustancial de la expresión de eNOS y un incremento en la expresión de la isoforma inducible (iNOS) (Figura 5A, columna 2), mientras que la expresión de la isoforma neuronal (nNOS) no mostró un cambio significativo excepto por un ligero incremento en las células en diferenciación en cuerpos embrionarios (Figura 5A, columna 3).

Adicionalmente, experimentos de cinética de la expresión de eNOS e iNOS en función del tiempo, mostraron que los niveles de expresión del ARNm de la eNOS disminuyen significativamente a partir del segundo día de cultivo en condiciones de diferenciación por la retirada del LIF, los niveles más bajos se observaron entre el cuarto y séptimo día (Figura 5B panel superior). Los niveles de expresión de iNOS fueron muy diferentes, la expresión de iNOS durante los primeros cuatro días fue baja y constante. El incremento en la expresión empezó a ser considerable a partir del quinto día, registrándose la mayor expresión al séptimo día (Figura 5B panel inferior).

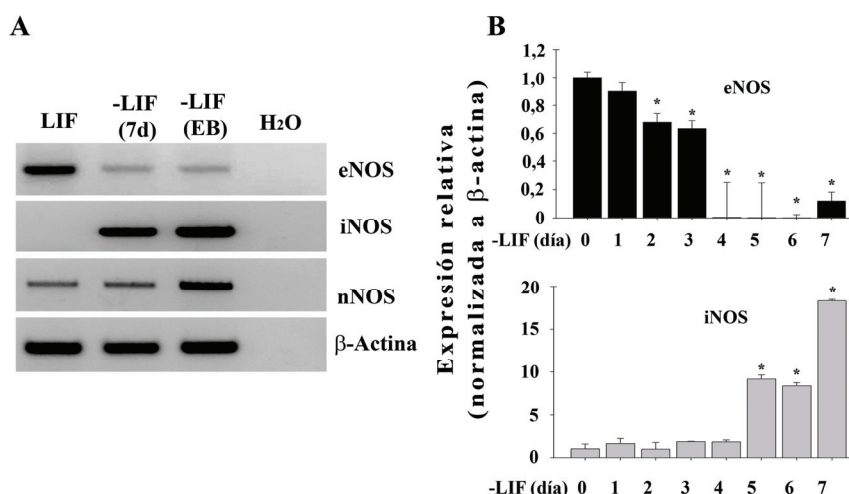


Figura 5. Cinética de expresión de isoformas de NOS en CMEs de ratón. **A.** La expresión de las isoformas de NOS, en CMEs no diferenciadas y durante la inducción de la diferenciación por retirada del LIF de medio de cultivo y además la formación de cuerpos embrionarios fue analizada por RT-PCR convencional. **B. Cuantificación de la** Expresión de eNOS e iNOS mediante qRT-PCR en tiempo real. Las células fueron cultivadas en ausencia de LIF durante 7 días, los protocolos de extracción de RNA y del desarrollo de las tipos de PCR se describen en Materiales y Métodos.

Así mismo, para comprobar la producción de NO en las CMEs se realizó una tinción con el colorante fluorescente 2-diacetato-diaminofluoresceína (DAF-2-DA), el cual es convertido por el NO de un estado no fluorescente permeable a un derivado triazol fluorescente impermeable en el interior de las células, de esta manera se puede detectar la producción de NO. En la Figura 6 se puede observar por microscopía de fluorescencia la producción de NO en las células no diferenciadas de las CMEs de ratón D3 silvestre y comparar con aquellas células de la misma línea expuestas a una fuente exógena de NO como el donador DETA-NO en ausencia de LIF como control positivo, además se muestra que tanto la retirada de LIF, como la inhibición de las NOS, con el inhibidor de la NOS citrato-monometil-arginina (*L-N^G-monomethyl arginine (L-NMMA)*), disminuyen ostensiblemente los niveles de detección de NO (Figura 6A). La producción de NO fue también observada en células de la línea D3 transfectadas con el ADNc de la eNOS, en la Figura 6B se puede observar que tanto en presencia de LIF, como en ausencia de LIF las células que sobreexpresan la eNOS producen NO, mientras que el tratamiento sobre estas mismas células cultivadas en ausencia de LIF con L-NMMA disminuyó drásticamente la producción de NO.

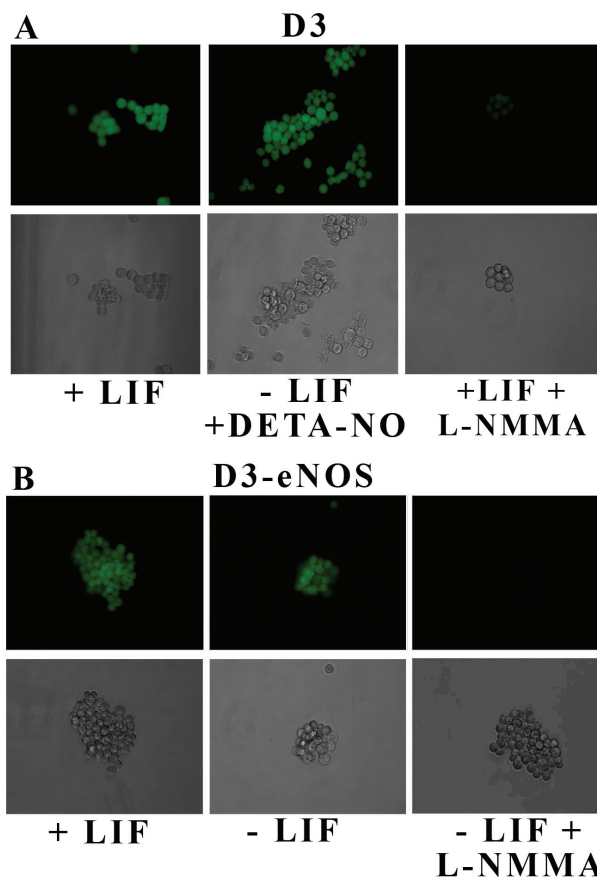


Figura 6. Detección por fluorescencia de la producción de NO en CMEs de ratón. Producción de óxido nítrico detectada por microscopía de fluorescencia a partir de tinción con DAF. En células D3 silvestres (A) y células D3 que sobreexpresan eNOS (B)

IV.2 Expresión y estabilidad de marcadores de autorrenovación y pluripotencia en las líneas celulares D3-pOct4-eGFP y D3-pOct4-eGFP-eNOS.

Los estudios de pluripotencia y autorrenovación de las CMEs se ven facilitados con la generación de líneas reporteras de CMEs con promotores de genes de pluripotencia, ya que permite la selección de poblaciones celulares homogéneas que expresan altos niveles de estos

marcadores. La transfección de la línea D3 con el gen que expresa la proteína verde fluorescente (GFP) regulada por el promotor de Oct4, permitió seleccionar por citometría de flujo a las células que expresan la proteína verde fluorescente (eGFP) y de esta manera enriquecer la población con células que muestran una alta expresión del marcador de pluripotencia Oct4. Por otro lado la transfección de esta misma línea celular con el ORF de eNOS permitió estudiar los efectos de la expresión endógena de esta isoforma sobre la autorrenovación de las CMEs de ratón. Ambas líneas celulares formaron colonias que emiten fluorescencia verde, confirmado por microscopía de fluorescencia y por citometría de flujo (Figura 7A y 7B).

La caracterización de estas líneas modificadas se muestran en la Figura 8A. Se observa que la expresión de los marcadores de pluripotencia Oct4, Sox2 y Nanog es mayor en ambas líneas modificadas en comparación con la línea silvestre D3. Adicionalmente, se midió la actividad de telomerasa como otro parámetro de no diferenciación, la actividad de esta enzima permanece alta en las células madre, capaces de autorrenovación infinita y sugiere que probablemente juega un papel importante en el mantenimiento de las CMs en estado no diferenciado [63]. Por esta razón, además de los patrones de expresión incrementados decidimos cuantificar la actividad telomerasa en estas células y encontramos que la actividad fue ligeramente superior en la línea D3-pOct4-eGFP, pero notablemente superior en la línea D3-pOct4-eGFP-eNOS con respecto a la línea silvestre D3 (Figura 8B). Finalmente, las células muestran un cariotipo estable con 19 cromosomas autosómicos y un par de cromosomas sexuales (XX) (Figura 8C).

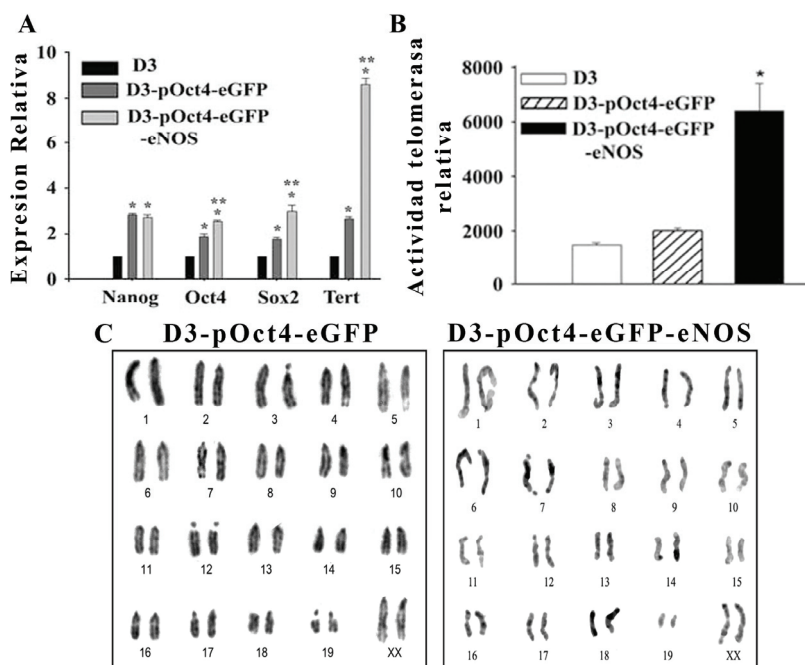
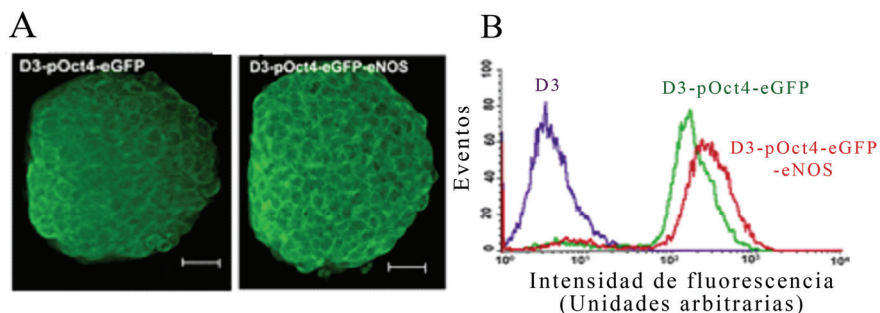


Figura 8. Las líneas de CMEs modificadas muestran alta actividad telomerasa y estabilidad del genoma. **A.** Comparación de la expresión de marcadores de pluripotencia en las células D3 silvestres, D3-pOct4-eGFP y D3-pOct4-eGFP-eNOS a través de PCR cuantitativa. **B.** Ensayo de actividad telomerasa en las células D3 silvestres, D3-pOct4-eGFP y D3-pOct4-eGFP-eNOS. **C.** Cariotipo de las células D3-pOct4-eGFP y D3-pOct4-eGFP-eNOS, para comprobar estabilidad genómica.

IV.3 Impacto de diferentes concentraciones de óxido nítrico exógeno sobre la regulación de marcadores de autorrenovación y diferenciación en CMEs de ratón.

Con la finalidad de determinar el efecto de la exposición exógena de las CMEs de ratón al NO, se realizó un estudio de dependencia de dosis. Las células fueron cultivadas en presencia y ausencia de LIF por 6 días y sometidas a tratamientos diarios con concentraciones crecientes de DETA-NO (0-50 μ M). Al término de los 6 días se recogieron las células para el análisis de marcadores de autorrenovación y diferenciación y para el ensayo de actividad de fosfatasa alcalina (FA), la alta actividad de esta enzima está asociada con la CMs pluripotentes no diferenciadas.

Los resultados mostrados en la Figura 9A muestran que en las células de la línea D3-pOct4-eGFP cultivadas en presencia de LIF los niveles de proteína Nanog se incrementaron de manera directamente proporcional con el aumento de la concentración del donador DETA-NO, observándose un incremento ligeramente superior a 20 μ M, mientras que la expresión de Oct4 no se vio notablemente afectada entre 0 y 20 μ M. Los niveles de proteína de estos dos marcadores disminuyeron a 50 μ M. Por otro lado, el cultivo de las células en ausencia de LIF, provocó una disminución de ambos marcadores, como ha sido reportado por otros autores previamente. Sin embargo los niveles de Oct4 y Nanog permanecieron altos con el tratamiento con DETA-NO entre 2 y 20 μ M, disminuyendo nuevamente con 50 μ M. De este modo, tenemos que la concentración óptima para la expresión de marcadores de pluripotencia está en el rango de 2 -20 μ M.

La detección de la actividad de fosfatasa alcalina (FA) fue detectada por microscopía, mediante la tinción con BCIP/NBT que actúa como sustrato para la detección de la actividad de FA, los resultados son mostrados en la Figura 9B. Las células no diferenciadas, cultivadas por cinco días en presencia de LIF, forman colonias redondeadas, con volumen y fuertemente teñidas, indicando una alta actividad de la enzima. Mientras que las células cultivadas en ausencia de LIF muestran claramente signos de diferenciación, como son: el crecimiento extendido y en monocapa y una tinción débil que refleja la baja actividad de FA. El tratamiento con diferentes dosis de DETA-NO muestra que las células presentan una morfología diferente a los controles y con colonias de menor tamaño y con una tinción propia de actividad FA. El porcentaje de colonias positivas para FA va disminuyendo de forma inversamente proporcional a la concentración de DETA-NO, siendo el número de colonias FA positivas mayor en las células tratadas con 2 μ M de DETA-NO. A partir de estos resultados, determinamos que la concentración óptima de 2 μ M de DETA-NO contribuye notablemente al establecimiento del estado de autorrenovación de la CME de ratón manteniendo activa la actividad de la FA.

Adicionalmente, el mismo estudio de dependencia de dosis se utilizó para estudiar la expresión de diferentes marcadores de diferenciación por PCR cuantitativa en tiempo real. La expresión de genes tempranos de diferenciación como Brachyury, Gata 4, Gata 6, Fgf 5 y Fgf 8 fue incrementada debido a diferenciación espontánea como consecuencia del cultivo en ausencia de LIF. Sin embargo el tratamiento con diferentes concentraciones de DETA-NO impide que estos genes incrementen su expresión. Se observa que la concentración

de 2 μ M de DETA-NO es la que contribuye a un mayor control de la expresión sobre estos genes de diferenciación (Figura 9C).

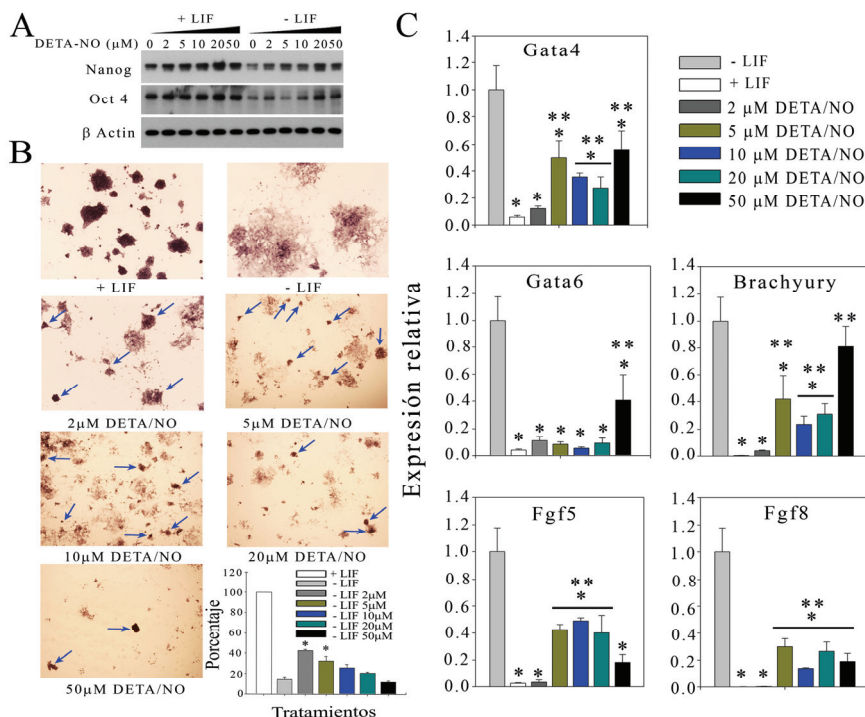


Figura 9. Estudio de dependencia de dosis del donador DETA-NO sobre la autorrenovación de las CMEs de ratón R1/E **A.** Efecto dependiente de dosis de NO sobre la expresión de proteína Oct4 y Nanog en CMEs D3-pOct4-eGFP en presencia y ausencia de LIF. Imagen representativa de tres WB. **B.** Medición de la actividad de fosfatasa alcalina, tinción observada por microscopía sobre células tratadas con diferentes concentraciones de DETA-NO. Porcentajes fueron obtenidos con respecto al número de colonias en el cultivo en presencia de LIF. **C.** Efecto dependiente de dosis de NO sobre la expresión génica de marcadores de diferenciación temprana obtenida por PCR cuantitativa. Datos normalizados con respecto a la expresión de β -actina. * $P \leq 0.005$ con respecto a las células cultivadas en ausencia de LIF. ** $P \leq 0.005$ con respecto a las células cultivadas en ausencia de LIF suplementada con 2 μ M DETA-NO.

IV.4 La sobreexpresión endógena de eNOS mantiene las CMEs de ratón en un estado no diferenciado.

La línea reportera D3-pOct4-eGFP-eNOS fue estudiada para observar los efectos de la producción de NO por la sobreexpresión de eNOS. Primero se analizó la expresión del marcador Oct4 mediante citometría de flujo cuantificando la cantidad de células GFP positivas. El cultivo de estas células en presencia de LIF resultó en un $70.9 \pm 3.1\%$ de células positivas para GFP, mientras que para las células cultivadas en ausencia de LIF el porcentaje de células GFP positivas fue de $51.8 \pm 9.1\%$, este porcentaje es significativamente mayor que las células D3-pOct4-eGFP cultivadas en ausencia de LIF. Cabe destacar que los porcentajes de expresión, corresponden a la cuantificación realizada en células cultivadas 10 pases después de la selección en el citómetro, lo que explica la disminución de los valores de Oct4 debido a la pérdida espontánea de fluorescencia en las células verdes. Por otro lado la inhibición de la actividad enzimática de la NOS con $400 \mu\text{M}$ del inhibidor L-NMMA disminuye el porcentaje de células GFP positivas hasta $16.4 \pm 5.8 \%$ (Figura 10). De esta manera se demuestra que la sobreexpresión de eNOS promueve una mayor expresión de Oct4 durante la ausencia de LIF y que una fuente de producción endógena de NO tiene un efecto similar al tratamiento con donadores de NO.

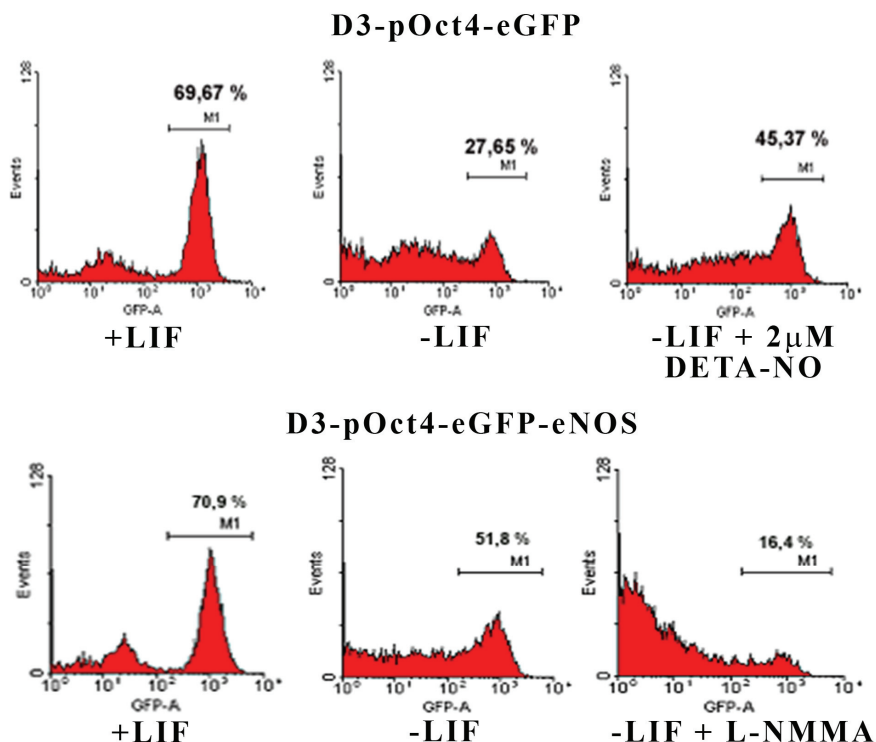


Figura 10. Perfiles de intensidad de fluorescencia obtenidos por citometría de flujo para la expresión de GFP en las células D3-pOct4-eGFP y D3-pOct4-eGFP-eNOS cultivadas en presencia y ausencia de LIF, y en presencia de inhibidor L-NMMA para el cultivo de las células que sobreexpresan eNOS.

A continuación, decidimos comprobar como se ve afectada la expresión de marcadores de autorrenovación/pluripotencia y diferenciación en la misma línea reportera. Los resultados de las PCR cuantitativas en tiempo real (qRT-PCR) muestran que la expresión de marcadores de pluripotencia como Oct4 Sox2 y Nanog es más alta en las células D3-pOct4-eGFP-eNOS cultivadas en ausencia de LIF que aquellas tratadas con 400 μ M del inhibidor L-NMMA en las mismas condiciones de cultivo, aunque los niveles de expresión de estos genes no llega a ser tan alto como el de las células crecidas en presencia de LIF (Figura 11 A). Así mismo, los niveles de proteína cuantificados por

densitometría de las bandas obtenidas por western blot confirman este patrón de expresión (Figura 11 B). La expresión del marcador temprano de diferenciación Brachyury se ve también afectada por la sobreexpresión de eNOS; en presencia de LIF su expresión es muy baja en comparación con las células cultivadas en ausencia de LIF. Sin embargo el tratamiento con el inhibidor, promueve el aumento de la expresión de este gen (Figura 11 C).

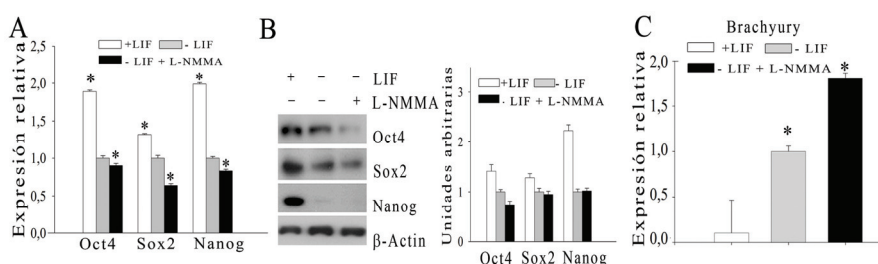


Figura 11 Expresión de marcadores de pluripotencia y diferenciación temprana en células D3-pOct4-eGFP-eNOS. **A.** Análisis de la expresión génica de marcadores de pluripotencia por PCR cuantitativa en células de la línea D3-pOct4-eGFP-eNOS. **B.** Patrón de expresión de proteínas para los marcadores de pluripotencia obtenido por western blot y cuantificación por densitometría. Normalización con respecto a β -actina. **C.** Análisis de la expresión génica del gen de diferenciación temprana Brachyury obtenido por PCR cuantitativa.

Además, utilizando microscopía de fluorescencia se estudió el nivel de intensidad de la presencia del antígeno marcador de superficie, SSEA-1 (Figura 12). La localización nuclear de Oct4 fue observada por la expresión de GFP en las células cultivadas en presencia de LIF, las colonias de estas células además presentaron una tinción intensa de SSEA-1. El cultivo en ausencia de LIF disminuyó la detección de SSEA-1 y de expresión de Oct 4, además presentan una morfología más extendida, mientras que el tratamiento con el inhibidor de NOS disminuyó drásticamente la detección de estos marcadores.

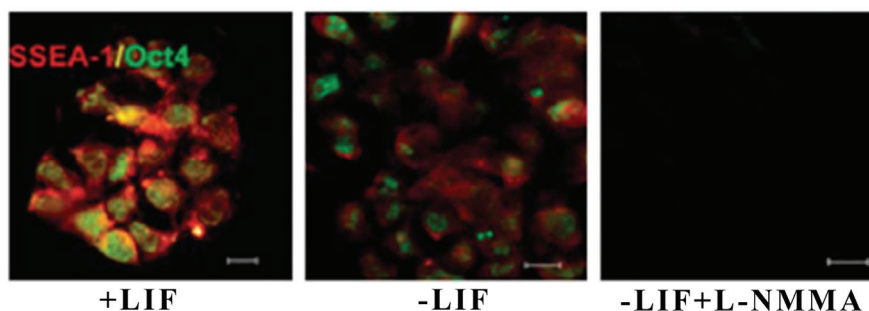


Figura 12. Imágenes de inmunofluorescencia de células positivas para el marcador de superficie SSEA-1 en las células D3-pOct4-eGFP-eNOS, cultivadas en presencia y ausencia de LIF y tratadas con el inhibidor de NOS L-NMMA.

IV. 5 Efecto del óxido nítrico sobre la apoptosis inducida por la ausencia de LIF en CMEs de ratón.

Uno de los eventos característicos del proceso de diferenciación en las CMEs durante el cultivo en ausencia de LIF es la apoptosis. Algunas señales que regulan vías de señalización apoptóticas son importantes para los procesos de diferenciación. Debido a estudios reportados del efecto del NO sobre la apoptosis, es que decidimos estudiar si las bajas concentraciones de NO podrían tener un efecto protector sobre las CMEs, considerando el efecto positivo sobre la autorrenovación que hemos mostrado en secciones anteriores.

Las células D3-pOct4-eGFP fueron cultivadas en medios suplementados con concentraciones que varían entre 2 y 50 μ M de DETA-NO en presencia y ausencia de LIF y luego se calculó el grado de fragmentación del ADN como un parámetro de apoptosis celular. Las células cultivadas en presencia de LIF y tratadas con DETA-NO a

concentraciones entre 2 y 20 μM no mostraron un aumento significativo de la fragmentación del ADN, mientras que la fragmentación a 50 μM se incrementó alrededor de 4 veces. Por otro lado las células cultivadas en ausencia de LIF bajo las mismas condiciones mostraron que el tratamiento entre 2 y 10 μM de DETA-NO fue capaz de conferir protección contra la apoptosis. Concentraciones mayores incrementan la apoptosis (3.5 veces a 20 μM y 8 veces a 50 μM) en comparación a las células cultivadas solo en ausencia de LIF (Figura 13 A).

A continuación evaluamos el efecto de las concentraciones endógenas del NO sobre la supervivencia celular en las células D3-pOct4-eGFP-eNOS. En estas células, una disminución significativa en la fragmentación del ADN fue observada cuando se cultivaron en ausencia de LIF en comparación con la fragmentación de la línea D3-pOct4-eGFP y la línea silvestre D3 en las mismas condiciones. Las células cultivadas en presencia de LIF no mostraron cambios significativos (Figura 13 B). Uno de los posibles mecanismos por los que el NO podría promover su efecto anti-apoptótico, es a través de la regulación de la expresión génica de proteínas involucradas en este proceso. Por esta razón, analizamos la expresión de genes pro-apoptóticos y anti-apoptóticos durante el tratamiento de las CMEs con 2 μM de DETA-NO. La figura 13 C muestra que los genes pro-apoptóticos como Bax, Bak1, Casp9 y Casp7 mostraron una clara disminución de su expresión. Mientras que aquellos genes que poseen actividad anti-apoptótica como Bcl2, Bcl2l11 y Birc6 incrementaron su expresión hasta 2 veces más en comparación con aquellas células cultivadas en ausencia de LIF.

Adicionalmente, por western blot se demostró que el tratamiento con 2 μ M de DETA-NO interrumpió la activación de la cascada de caspasas (Figura 13 D). Una de las dianas finales de la vía de las caspasas durante el proceso de apoptosis es la poly-ADP ribose polymerase (PARP) la cual sufre un corte produciendo dos péptidos; el corte de su principal efector Caspasa-3 también es un marcador de apoptosis activa. Las células tratadas con el inductor de apoptosis Staurosporina (1 μ M), así como las células cultivadas en ausencia de LIF, mostraron claramente la activación por corte de estas dos proteínas, por otro lado, no se observó corte de PARP en las células no diferenciadas. El tratamiento con 2 μ M de DETA NO disminuyó considerablemente la activación por corte de estas dos proteínas pro-apoptóticas.

IV. 6 Mantenimiento de la autorrenovación en CMEs de origen humano.

Las CMEs de origen humano tienen un comportamiento diferente a las CMEs de ratón. La variabilidad de respuesta entre líneas celulares es mayor en las CMEh, por lo tanto la reproducibilidad de un efecto depende de la edad de los pasajes y de las líneas seleccionadas. Nuestros resultados obtenidos en las líneas de ratón se intentaron replicar en CMEs humanas. Los experimentos se llevaron a cabo con la línea H181 de CMEs humanas provenientes del Instituto Karolinska de Suecia.

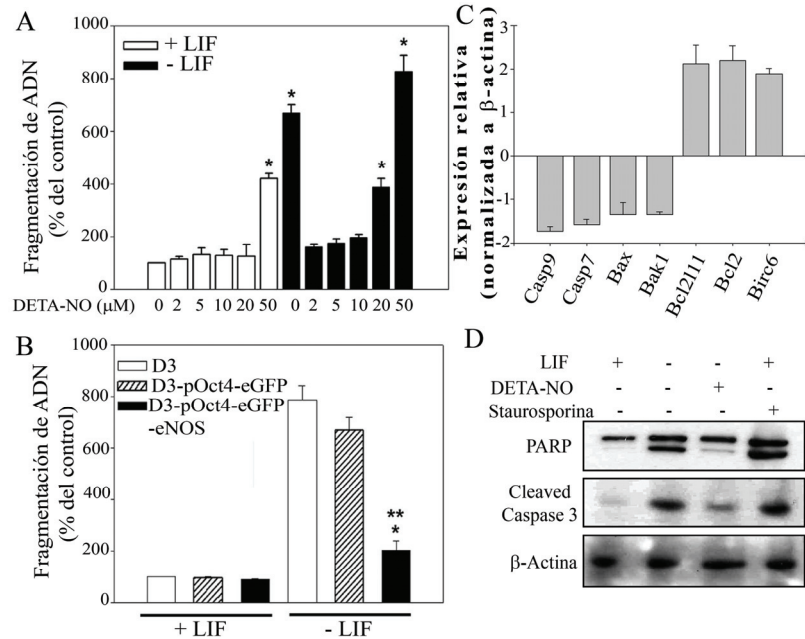


Figura 13 Efecto anti-apoptótico del tratamiento con óxido nítrico sobre las CMEs de ratón. **A.** Efecto de las diferentes dosis de NO sobre la apoptosis en presencia y ausencia de LIF, en la línea D3-pOct4-eGFP, evaluado por ensayo de fragmentación del ADN. * Representa el porcentaje significativo ($p < 0.005$) con respecto a los controles +LIF y -LIF. **B.** Comparación del porcentaje de fragmentación del ADN entre las células D3 silvestres, D3-pOct4-eGFP y D3-pOct4-eGFP-eNOS *Representa el porcentaje significativo ($p < 0.005$) con respecto al control -LIF. **Representa el porcentaje significativo ($p < 0.005$) con respecto al control +LIF. **C.** Expresión génica de genes pro-apoptóticos y anti-apoptóticos de la línea D3-pOct4-eGFP tratada con 2 μM de DETA-NO. Ensayo de PCR cuantitativa normalizado a los valores de expresión de β-actina. **D.** Efecto del NO sobre el corte de PARP y Caspasa 3 en la línea D3-pOct4-eGFP luego del cultivo en presencia y ausencia de LIF. El control positivo de apoptosis fueron células tratadas con 1 μM de Staurosporina por 4 horas. Los datos son medias de tres experimentos independientes.

Las CMEh son mantenidas en estado no diferenciado adicionando al medio de cultivo 8 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblastos básico (*bFGF*). Cuando las células fueron cultivadas en ausencia de bFGF mostraron colonias expandidas con áreas blancas en el centro, lo cual es típico de células diferenciadas. La adición de 2μM

de DETA-NO en estas condiciones de diferenciación, mantiene las características del estado no diferenciado de estas células hasta por cinco pases sucesivos (Figura 14 A, fila superior), además de la morfología las colonias tratadas con DETA-NO mostraron una alta expresión del marcador Oct4, como es mostrado en la inmunofluorescencia de la (Figura 14 A fila inferior).

A continuación, analizamos la presencia del antígeno de superficie SSEA-4, marcador asociado con la autorrenovación de las CMEs humanas. La figura 14 B muestra la inmunofluorescencia de SSEA-4, donde se observa que SSEA-4 desaparece después de 6 días de cultivo en ausencia de bFGF, pero la expresión se mantuvo durante el tratamiento con 2 μ M de DETA-NO a niveles similares a los encontrados en células cultivadas en presencia de bFGF.

Los valores cuantitativos de la expresión génica de los marcadores de pluripotencia y diferenciación en CMEs humanas muestran que Nanog, Oct4 y Sox2 disminuyeron considerablemente en células cultivadas en la ausencia de bFGF, por el contrario las células cultivadas de la misma manera pero tratadas con 2 μ M de DETA-NO mantuvieron altos los niveles de ARNm de estos marcadores, incluso a niveles más altos que las células cultivadas en presencia de bFGF (Figura 15 A). Estos resultados fueron confirmados por Western Blot para los niveles de proteína (Figura 15 B).

La expresión de los genes de diferenciación tales como Brachyury y Gata4 mostraron un incremento significativo de su expresión en las células sometidas a diferenciación (-bFGF), mientras

que las células tratadas con DETA-NO mostraron una expresión significativamente más baja (Figura 15 C).

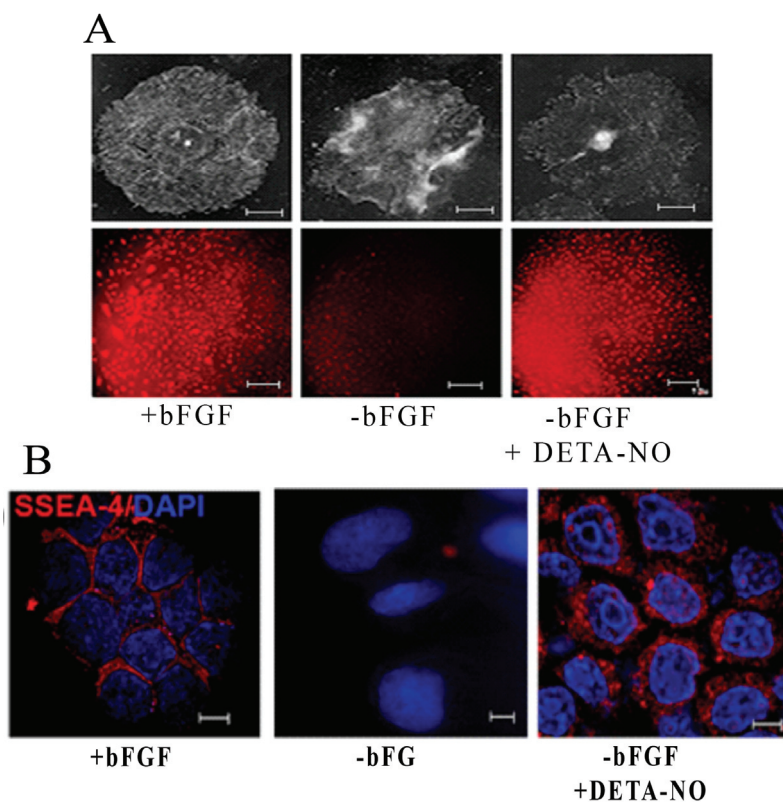


Figura 14 El óxido nítrico promueve la expresión de marcadores de autorrenovación en CMEs humanas. **A.** Imágenes de microscopía de fluorescencia y campo claro para el marcador Oct4 en las CMEs humanas H181 cultivadas en presencia y ausencia de bFGF y tratadas con 2 μ M de DETA-NO. **B.** Imágenes de microscopía de fluorescencia confocal de las CMEs humanas H181 positivas para el marcador de superficie SSEA4.

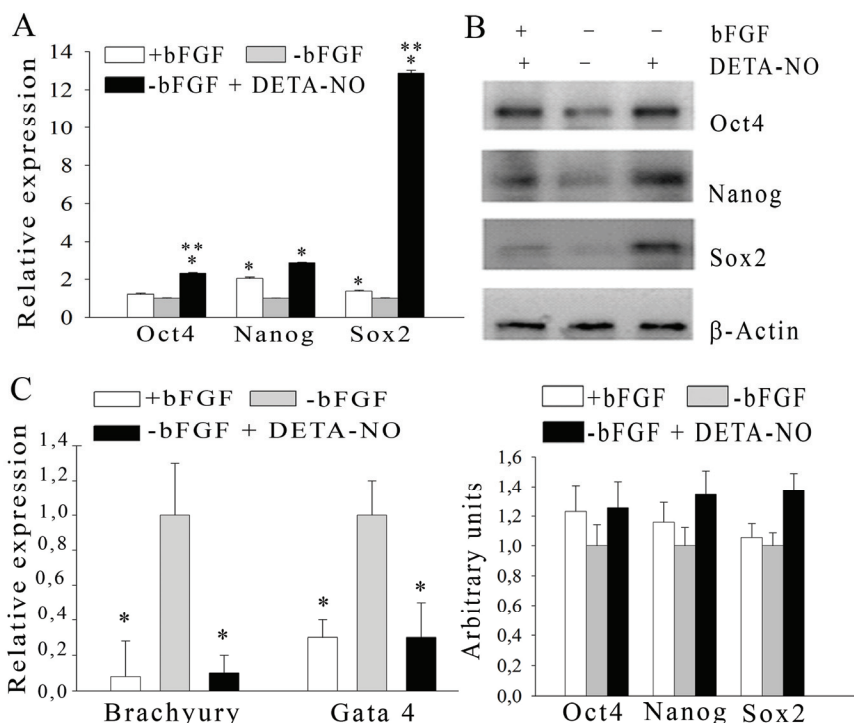


Figura 15. Expresión de marcadores de autorrenovación y pluripotencia en las CMEs humanas. **A.** Análisis de expresión génica por PCR cuantitativa de marcadores de pluripotencia en las CMEs humanas H181 durante el cultivo en presencia o ausencia de bFGF y tratadas con 2 μ M de DETA-NO. Expresión normalizada con respecto a β -actina. **B.** Patrón de expresión de proteínas para los marcadores de pluripotencia obtenido por western blot y cuantificación por densitometría. Normalización con respecto a β -actina. **C.** Análisis de la expresión génica de los genes de diferenciación temprana Brachyury y Gata 4 obtenido por PCR cuantitativa. Los datos son medias de tres experimentos independientes.

IV.7 El ensayo de formación de teratomas confirma la identidad pluripotente de las CMEs tratadas con bajas concentraciones de óxido nítrico.

Las CMEs pluripotentes, presentan la capacidad de diferenciarse a células pertenecientes a las tres capas germinales de un embrión (endodermo, mesodermo y ectodermo), también tienen la capacidad de formar teratomas y ratones quiméricos. Las CMEs pluripotentes cuando son inyectadas en ratones inmunodeprimidos forman teratomas. Estos tumores son muy característicos pues contienen simultáneamente tipos de tejidos derivados de las tres capas germinales.

Las CMEs de ratón cultivadas en ausencia de LIF y suplementadas con 2 μ M de DETA-NO fueron inyectadas en ratones. Seis semanas después de la inyección, los teratomas fueron observados en 2 de 3 ratones inyectados con células no diferenciadas (+LIF). Ningún teratoma se observó en células crecidas en ausencia de LIF. Los tres animales inyectados con células tratadas con 2 μ M de DETA-NO cultivadas en ausencia de LIF desarrollaron teratomas (Figura 16).

Los ratones presentaron múltiples teratomas formados con tejidos derivados de las tres capas germinales: i) endodermo (tejido glandular); ii) mesodermo (cartílago) y iii) ectodermo (pelo). (Figura 17 A, B, C). Similarmente, la aparición de teratomas fue observada en uno de tres ratones inmunodeprimidos ocho semanas después de la inyección de las CMEs humanas no diferenciadas mantenidas en cultivo con 8 ng/ml de bFGF. Las células cultivadas en ausencia de

bFGF y tratadas con 2 μ M de DETA-NO fueron capaces de desarrollar teratomas en tres de cinco animales. Ningún teratoma fue obtenido en animales inyectados con células cultivadas solo en ausencia de bFGF. Los teratomas contenían tejidos derivados de las tres capas germinales: i) endodermo (tejido glandular); ii) mesodermo (músculo); y iii) ectodermo (queratinocitos) (Figura 17 D, E, F).

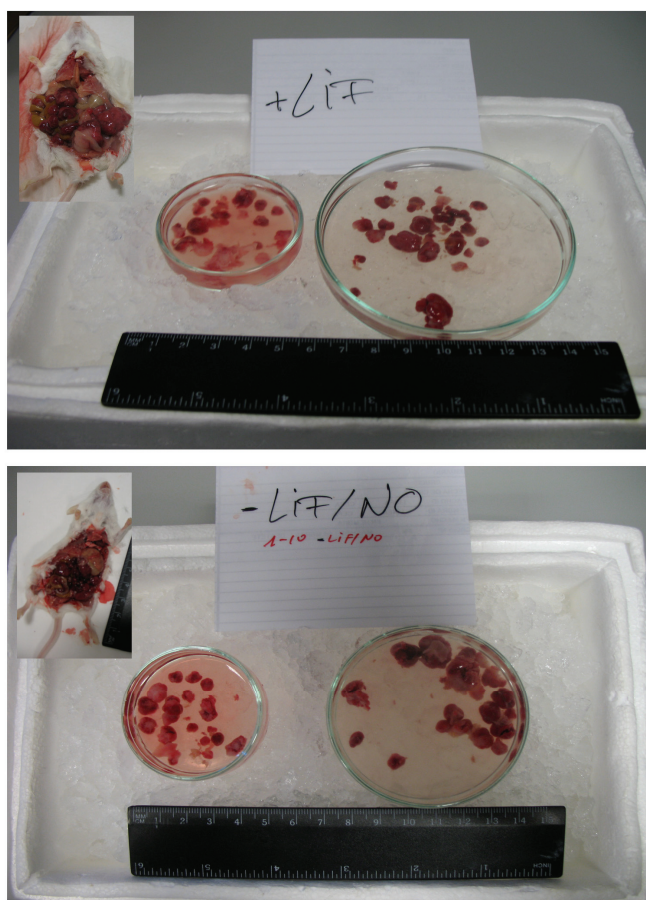


Figura 16. Ensayo de formación de teratomas por CMEs de ratón. Cultivos de CMEs en ausencia de LIF y bFGF y tratadas con 2 μ M de DETA-NO fueron inyectadas en ratones SCID-CB17 y mantenidos por seis semanas. La extracción de teratomas se realizó en los ratones inyectados con células no diferenciadas (+LIF) y en aquellas tratadas con 2 μ M de DETA-NO (-LIF/NO). No se observó formación de teratomas en ratones inyectados con células crecidas en ausencia de LIF.

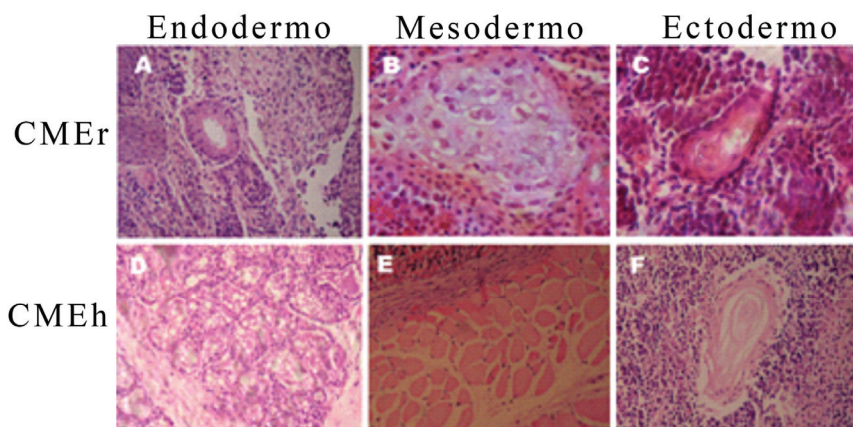


Figura 17 Ensayo de formación de teratomas por CMEs de ratón y humanas. Cultivos de CMEs en ausencia de LIF y bFGF y tratadas con $2 \mu\text{M}$ de DETA-NO fueron inyectadas en ratones SCID-CB17 y mantenidos por seis semanas. Las secciones de los teratomas fueron teñidos con hematoxilina y eosina. (Magnificación en A 400X, B y C 200X. D, E, F 100X)

Los resultados mostrados en estas primeras secciones nos permitieron proponer un papel del NO para la modulación de la autorrenovación de las CMEs y en la prevención de la entrada de las CMEs en los eventos de diferenciación (Figura 18 A). Por lo que a continuación propusimos el siguiente estudio resumido en la figura 18B, implementando una estrategia para caracterizar el efecto de bajo NO sobre el transcriptoma de las CMEs para estudiar los cambios en los niveles de expresión de genes de autorrenovación, remodelación de cromatina y muerte celular entre otras funciones.

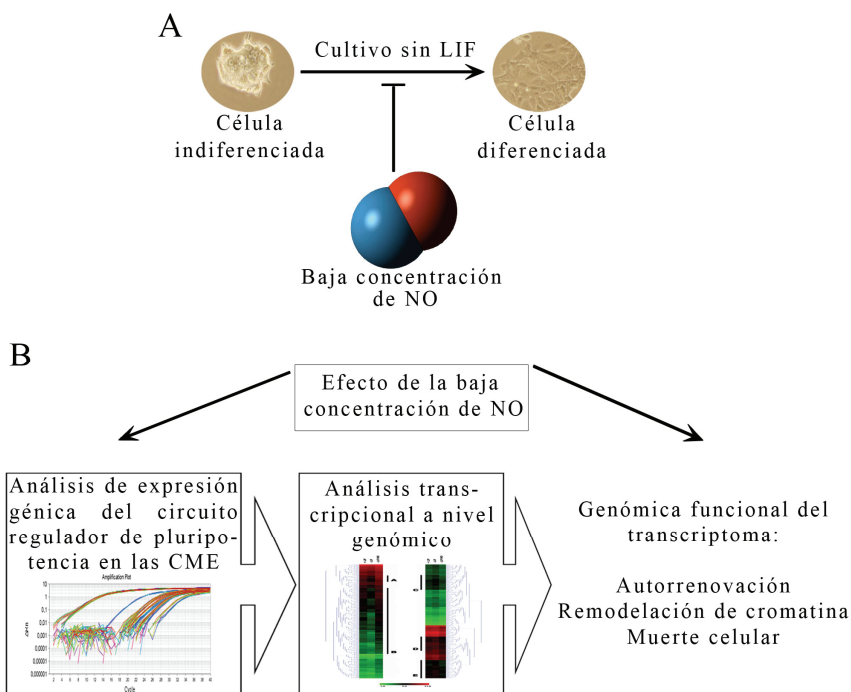


Figura 18 Diseño de estudio del efecto de las bajas concentraciones de NO sobre el transcriptoma de las CMEs. **A.** Papel de las bajas concentraciones de NO sobre las CMEs en diferenciación propuesto durante el desarrollo de esta tesis. **B.** Estrategia para la caracterización del transcriptoma de las CMEs tratadas con 2 μ M de DETA-NO durante la diferenciación en ausencia de LIF.

IV.8 El óxido nítrico modifica la expresión de genes relacionados a la red de regulación transcripcional de la autorrenovación.

Para el desarrollo del diseño experimental mostrado en la figura 18 A, utilizamos la línea de CMEs de ratón R1/E cultivadas en ausencia de LIF y tratadas con 2 μ M de DETA-NO para estudiar el efecto del NO sobre el transcriptoma de las CMEs durante la diferenciación espontánea inducida por la ausencia de LIF. La expresión de genes seleccionados reportados previamente como componentes de la

maquinaria de regulación transcripcional responsable del estado de pluripotencia y autorrenovación (troncalidad) de las CM fue estudiada por PCR cuantitativa en tiempo real.

Los resultados obtenidos muestran que el tratamiento con NO incrementó la expresión de genes tales como: Zic3, Zic1, FoxD3, Ronin (Thap11), Creb1, cMyb, Sin3A, Sall4 y Dax1 (Nr0b1), aunque no siempre a valores equiparables con los de las células no diferenciadas (+LIF). Otro grupo de genes disminuyeron su expresión como: cMyc, Esrrb y Rex1 (Zfp42), mientras que la expresión de Dppa3, Zfx y nMyc permaneció sin cambio significativo (Figura 19).

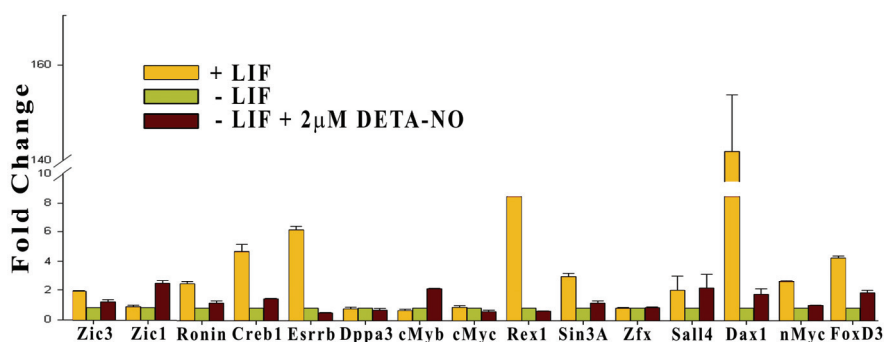
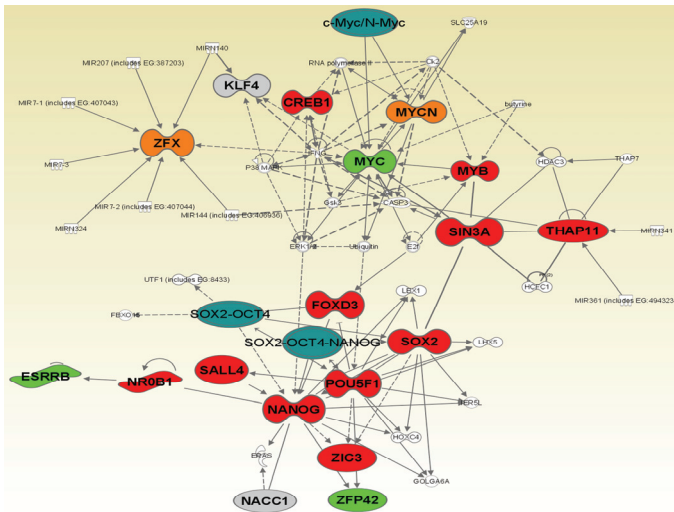


Figura 19. Análisis de expresión génica por PCR cuantitativa de los genes del circuito de regulación transcripcional de la pluripotencia en las CMEs de ratón. Los valores de expresión fueron normalizados con respecto a β -actina y tomando como muestra de referencia las células cultivadas en ausencia de LIF.

Basados en estos resultados de expresión, generamos una red de interacción génica bajo la influencia del NO para marcadores de autorrenovación y pluripotencia usando el *Path Designer Tool* de la plataforma Ingenuity Pathway Analysis (IPA[®]) (Figura 20). El grupo compuesto por el mayor número de genes está representado por Nanog, Oct4 y Sox2 como genes centrales, a continuación FoxD3, Sall4, Dax1



IV.9 Análisis del transcriptoma revela efectos globales del óxido nítrico en la expresión génica de las CMEs de ratón.

Hasta ahora hemos analizado funciones concretas seleccionadas desde un punto de vista reduccionista, sin embargo queda latente la duda si es que el NO afecta a funciones específicas o si es un efecto global sobre la biología de la células. Para responder esa pregunta diseñamos experimentos de microarrays con la finalidad de analizar el efecto del NO sobre el transcriptoma de las CMEs de ratón. Para ello, tres pases sucesivos de la línea D3-pOct4-eGFP fueron usados para los ensayos de expresión en formato de *microarrays* de ADNc. Para estos experimentos se utilizaron muestras de ARN purificado de células cultivadas en las condiciones experimentales descritas utilizando 2 μ M de DETA-NO durante 6 días.

Los experimentos de *microarrays* de ratón analizan un total de 45,102 sondas, de las cuales se encontraron que 1974 se expresan diferencialmente en las células tratadas con 2 μ M de DETA-NO con un valor de cambio \geq a 1.2 y un nivel de confianza mayor a 95 % ($p\text{-value} < 0.05$) con respecto a las células tratadas solo en ausencia de LIF. De estas sondas, 1442 corresponden a genes correctamente representados. El tratamiento con el donador de NO no indujo una modulación severa sobre la expresión relativa para la mayoría de las sondas, esto debido a que la concentración usada es cercana a la concentración fisiológica producida por las células. Menos del 12 % de las sondas mostraron un incremento de alrededor de cuatro veces y solo una sonda disminuyó más de cuatro veces. Así, considerando el alto porcentaje de sondas con valores entre 1.2 y 3 veces de cambio en la expresión relativa (73 %

para genes que incrementan su expresión y 87 % para genes que disminuyen su expresión), es que consideramos aplicar un valor de corte de 1.2 para la expresión relativa y que además satisfaga un nivel de significancia estadística con un $p < 0.05$ (Figura 21).

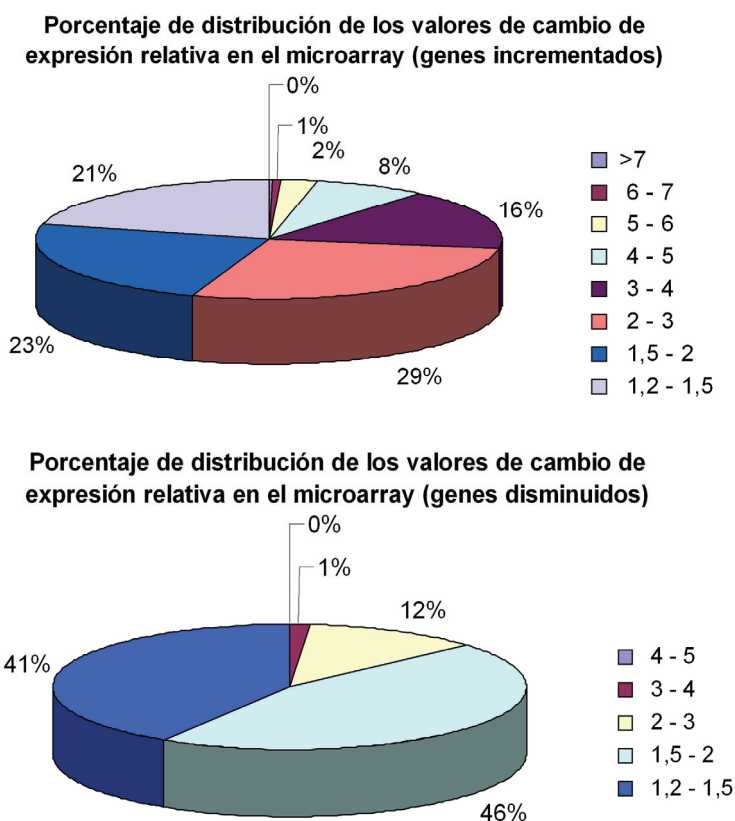


Figura 21. Diagramas de sectores de la distribución de los porcentajes de sondas reguladas por el óxido nítrico. Los porcentajes se obtuvieron a partir de los valores de expresión relativa diferencial para genes que incrementaron o que disminuyeron su expresión.

Seguidamente se hizo una clasificación de estos genes expresados diferencialmente de acuerdo a las categorías encontradas en la ontología génica (*gene ontology GO*). La clasificación se llevó a

cabo de acuerdo a los procesos biológicos representados con el mayor número de genes modificados por el NO (> 50 genes; $p < 0.05$). Entre ellos encontramos: muerte celular, ciclo celular, supervivencia de organismos, y bioquímica de moléculas pequeñas. Otros procesos también significativos pero con un número menor de genes (< 50 genes; $p < 0.05$) incluyeron aquellas relacionadas a procesos del desarrollo, metabolismo de lípidos, replicación y reparación de ADN, crecimiento, proliferación celular y expresión génica (Figura 22 A). La Tabla 2 resume un listado detallado de estas categorías.

El siguiente nivel de análisis correspondió a clasificar por ontología génica separando los genes inducidos de aquellos genes reprimidos. Así, en el diagrama de sectores de la Figura 22 B podemos observar las categorías funcionales más representadas:

- i) De todos los genes que incrementaron su expresión 13% pertenecen a la categoría de crecimiento y desarrollo celular; otro 13% a desarrollo embrionario y de organismos. Mientras que dos fracciones de 5% correspondieron a funciones metabólicas y muerte celular; 10% correspondieron a expresión génica, y solo el 3% fueron genes del ciclo celular. El 51% restante pertenece a otras categorías.
- ii) Con respecto al total de todos los genes que disminuyeron su expresión: 12% son genes involucrados en funciones metabólicas y otro 12% caen en la categoría de desarrollo embrionario y de organismos. Tres fracciones de 5% correspondieron a genes del ciclo celular, crecimiento y desarrollo celular y muerte celular. Finalmente, solo 3%

pertenecieron a la categoría de expresión génica. El 58% restante pertenecieron a otras categorías.

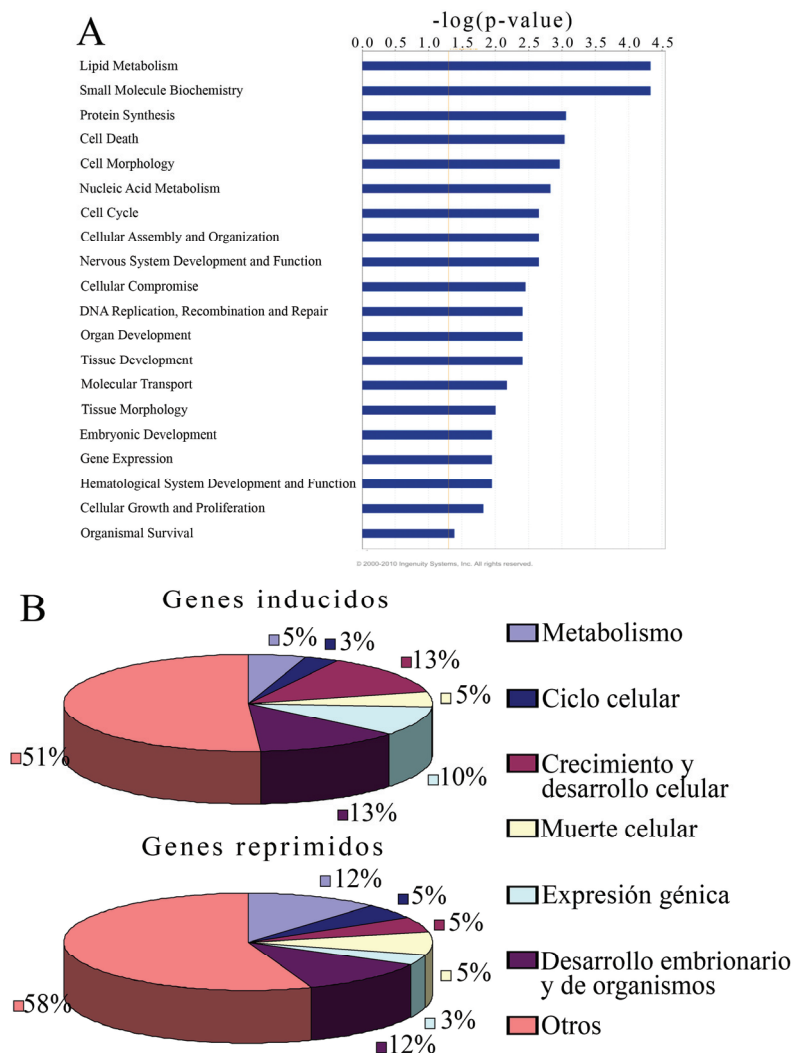


Figura 22. Distribución de las categorías funcionales afectadas por el tratamiento con óxido nítrico en las CMEs de ratón. A) Anotación funcional para las sondas expresadas diferencialmente a partir de la comparación de las células D3-pOct4-eGFP tratadas con 2 μ M de DETA-NO y aquellas cultivadas en ausencia de LIF. $p \leq 0.05$ calculado por la prueba de Fisher exacta. B. Diagrama de sectores que representa el porcentaje de distribución de las categorías funcionales principales entre los genes inducidos o reprimidos.

El agrupamiento jerárquico (*hierarchical clustering*) es un método determinista basado en una matriz de distancias que establece pequeños grupos de genes que tienen un patrón de expresión común y los representa en un dendograma de forma secuencial. La base de datos con las 1442 sondas que presentaron una expresión diferencial significativa fueron introducidas en el paquete informático *Multi Experiment Viewer* (MeV v4.1) para generar un mapa de calor (*heat map*) usando la herramienta de agrupamiento jerárquico por distancias euclidianas. En el mapa de calor resultante mostrado en la Figura 23 A se generaron dos grupos principales de genes, uno de los cuales comprende 696 genes que incrementaron su expresión (grupo 1) y 746 genes que reprimieron su expresión (grupo 2). A su vez cada grupo fue dividido en dos sub-grupos. Los sub-grupos 1a y 2a comprendieron genes expresados con una intensidad similar a las células indiferenciadas (control +LIF), mientras que los sub-grupos 1b y 2b incluyeron genes exclusivamente regulados por NO.

Adicionalmente, entre los genes pertenecientes a los grupos 1a y 2a se encuentran 32 y 73 genes comunes entre las células tratadas con NO y las células cultivadas en presencia de LIF (no diferenciadas), que incrementan y disminuyen su expresión respectivamente (Figura 23 B). Las tablas 3 y 4 contienen las categorías funcionales para estos genes comunes. De esta manera genes comunes implicados en auto-renovación, diferenciación y desarrollo tales como: *Ext1*, *L1Cam* y *Spred1* se encontraron inducidos en ambos tratamientos, mientras que aquellos involucrados en desarrollo de organismos o en desarrollo de órganos o tejido neural o cardiovascular, tales como la proteína de interacción con beta-catenina1 (*Ctnnbip1*), *Stc*, *Itgam*, *Cat*, *Nr1d1*, *Trio*

y Ywhae se encontraron reprimidos. Estos genes comunes no están relacionados a la vía LIF/Stat3, pero en su lugar participan en el mantenimiento del metabolismo de heparan-sulfato a través de la expresión de Ext1 y de la molécula de adhesión celular L1Cam, moléculas relacionadas a la señalización de FGF. El NO también reguló negativamente la expresión de componentes de la β -Catenina, así como de genes implicados en la regulación del compromiso hacia linajes de mesodermo y ectodermo.

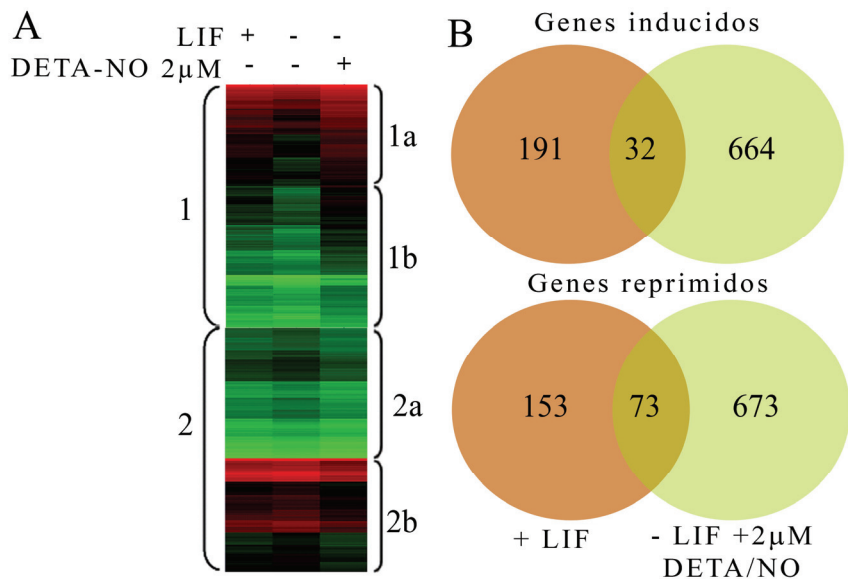


Figura 23. El óxido nítrico promueve la expresión de genes comunes con las células cultivadas en presencia de LIF. **A.** Análisis de agrupamiento jerárquico de las variaciones de expresión de genes inducidos por NO. Los corchetes 1 y 2 representan los dos grupos principales con sus respectivos sub-grupos. **B.** Diagramas de Venn que representan el número de genes comunes inducidos o reprimidos entre las células no diferenciadas (+LIF) y las células tratadas con NO en la ausencia de LIF (-LIF + 2 μ M DETA/NO).

IV.10 El tratamiento con óxido nítrico modifica el transcriptoma de las CMEs humanas de manera análoga al de las CMEs de ratón.

En los últimos años se ha podido esclarecer que los mecanismos que determinan las vías de señalización de pluripotencia y autorrenovación pueden ser específicos de especie y que los componentes y/o vías de señalización que la regulan aun no se conocen completamente. Así, es común que encontremos que las CMEs de ratón respondan de manera diferente a la acción de una molécula que las CMEs humanas, aunque para el caso del NO como ya hemos visto en secciones anteriores, las CMEs de humanas responden de manera análoga a las CMEs de ratón con respecto a la expresión de marcadores de autorrenovación y pluripotencia, así como una disminución de marcadores de diferenciación.

Continuando con la misma línea de pensamiento decidimos analizar el efecto del NO sobre el transcriptoma de la línea H181 de CME humanas con la finalidad de evaluar el grado de reproducibilidad de la respuesta entre las dos líneas de CMEs. Se realizaron experimentos de microarray humanos que analizan un total de 54,676 sondas. 1195 fueron expresadas diferencialmente en las células tratadas con 2 μ M de DETA-NO con un valor de cambio \geq a 1.2 y un nivel de confianza mayor a 95% ($p\text{-value} < 0.05$). En resumen, podemos apreciar como el tratamiento sobre las CMEs humanas promueve la regulación de funciones biológicas análogas a las CMEs de ratón, a pesar de la diferencia del número de genes que para cada categoría difiere entre ambas especies (Figura 24). Un listado con las principales funciones reguladas por el tratamiento con NO es listado en la tabla 5.

Por otro lado, comparando las bases de datos de ambas especies, encontramos 24 genes comunes que son regulados durante el tratamiento con NO. Estos genes comunes caen en las categorías de expresión génica, muerte celular, ciclo celular y desarrollo embrionario, entre otras menores (Figura 25 A y 25 B). Por otro lado 29% de estos genes mostraron un patrón de expresión similar y se encuentran listados en la Tabla 6.

De los resultados presentados podemos concluir que el NO tiene un efecto global sobre el transcriptoma de la CMEs ya sean estas humanas o de ratón. Tomando en cuenta la anotación funcional desplegada para ambas bases de datos, podemos destacar que el tratamiento con bajas concentraciones de NO específicamente a 2 μ M del donador DETA-NO posee una influencia sobre la regulación de funciones celulares importantes para la autorrenovación de estas células, como: Muerte celular/apoptosis; Autorrenovación, Pluripotencia y Diferenciación; Ciclo celular y regulación de la expresión génica. En las siguientes secciones analizaremos en detalle cada una de estas funciones.

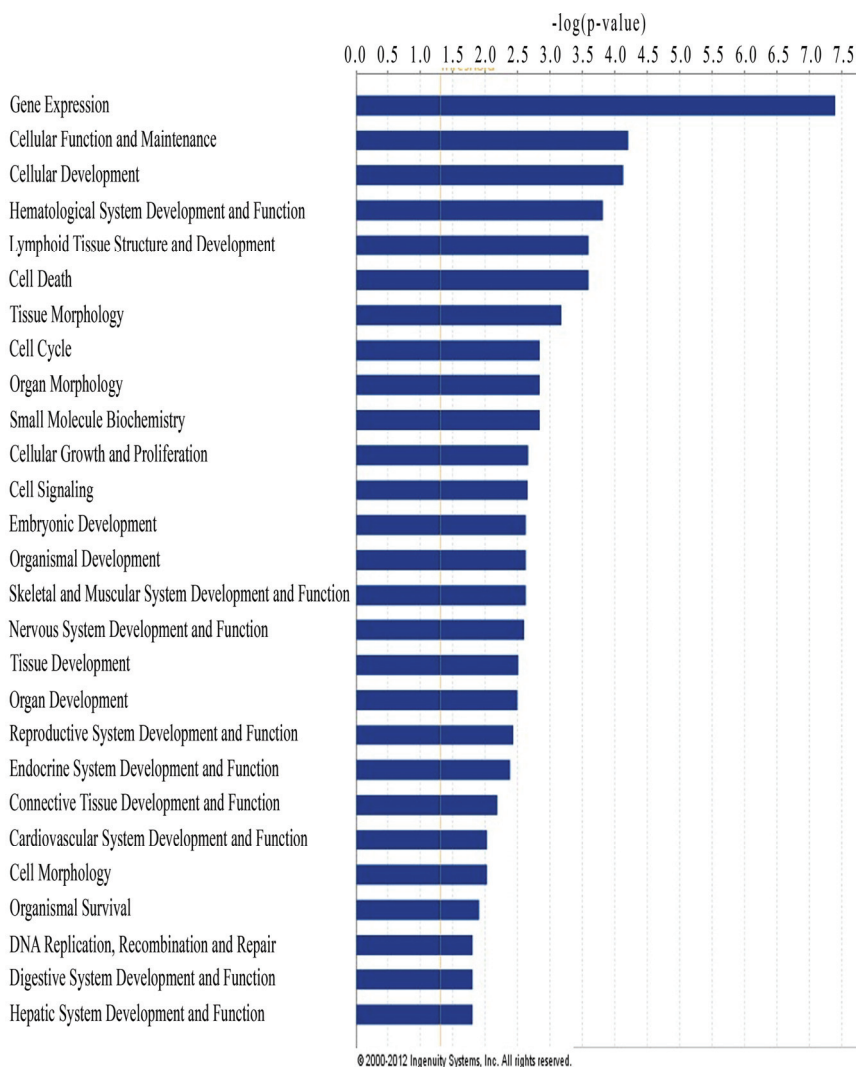


Figura 24 Distribución de las categorías funcionales afectadas por el tratamiento con óxido nítrico en las CMEs humanas. Anotación funcional para las sondas expresadas diferencialmente de la comparación de las células H181 tratadas con $2 \mu\text{M}$ de DETA-NO y cultivadas en ausencia de bFGF $p \leq 0.05$ calculado por la prueba de Fisher exacta.

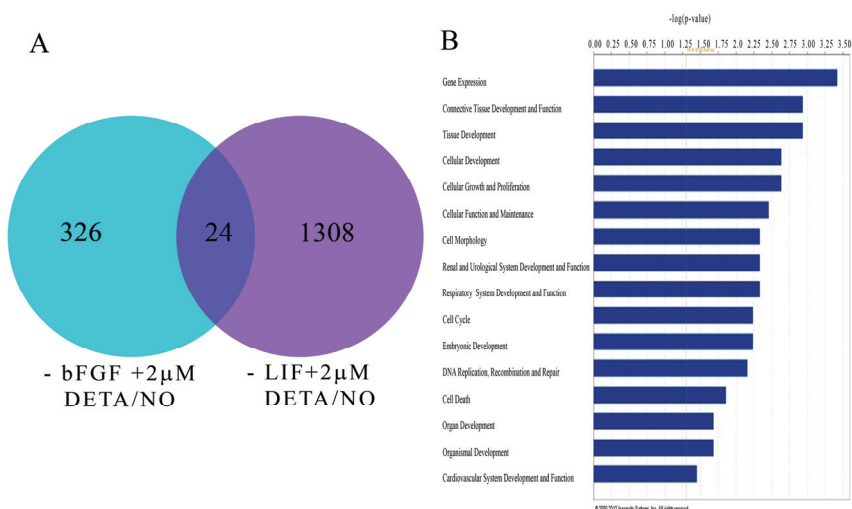


Figura 25. Distribución de las categorías funcionales para los genes comunes entre las CMEs de ratón y humanas regulados por el óxido nítrico. A. Diagrama de Venn que representa los genes comunes entre las CMEs humanas y de ratón, con cambios en la expresión promovida por el tratamiento con NO **B.** Anotación funcional para los 24 genes comunes obtenidos de la comparación entre las CMEs humanas y de ratón.

IV.11 El tratamiento con óxido nítrico modula la expresión de genes involucrados en muerte celular y regulación del ciclo celular.

Los resultados obtenidos de los estudios de expresión a nivel genómico en el que se analiza un gran número de genes en simultáneo, necesitan ser validados analizando la expresión gen por gen usando PCR cuantitativa en tiempo real, o con técnicas que contribuyan a confirmar el efecto sobre la función afectada en el modelo biológico propuesto. Usando PCR cuantitativa en tiempo real a partir de ARN de la línea D3-pOct4-eGFP se analizó un grupo de 13 genes que mostraron los más altos valores de inducción o represión en su expresión. Los valores de expresión relativa para estos genes fueron comparados con los valores de expresión diferencial obtenidos del ensayo de

microarrays. Se observó correlación entre los datos del ensayo de *microarrays* y la PCR cuantitativa. La mayoría de estos genes analizados están involucrados en procesos de muerte celular como Bcl2, Cdk6, Parp1 o Casp9; además de factores de transcripción como Pbx1 (Figura 26 A). Para comprobar si la correlación de la expresión se repetía en otras líneas celulares se analizó otro grupo de seis genes relacionados con la remodelación de cromatina, en la línea R1/E, y al igual que con el primer grupo, encontramos una alta correlación entre los valores de expresión entre los ensayos de *microarrays* y la PCR cuantitativa (Figura 26 B).

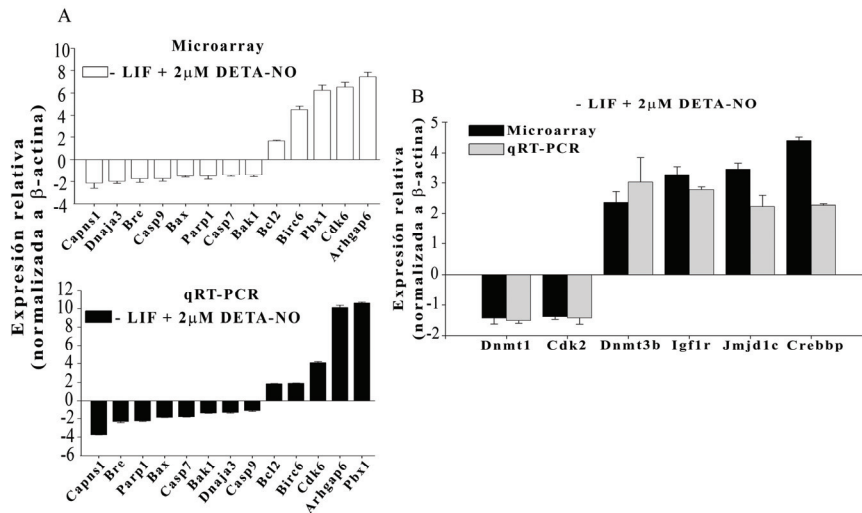


Figura 26. Validación de los datos del microarray a través de PCR cuantitativa. A. Validación de los datos del microarray a través de PCR cuantitativa para los genes con mayor cambio de inducción o represión y que participan en muerte celular. **B.** Validación para un segundo grupo de genes implicados en remodelación de cromatina.

Una vez validado este grupo de genes, se analizó la base de datos de los genes diferencialmente expresados con NO, con la finalidad de observar las posibles vías de señalización en la que participan los genes regulados por el tratamiento. La herramienta de

diseño de vías canónicas de la plataforma IPA generó un gráfico con los genes de las vías de señalización que pueden estar afectadas por el tratamiento con NO. Todas ellas con un *score* alto y un *p-value* significativo. Entre ellas destacamos la vía de señalización de la apoptosis la cual está altamente enriquecida significativamente con 19 genes modificados por el NO donde se puede apreciar que el efecto anti-apoptótico del NO es a través de la modulación de efectores mitocondriales (Figura 27). Esta información se ajusta a nuestras observaciones previas de la figura 9, en el sentido que el NO disminuye la expresión de genes pro-apoptóticos como Casp7, Aatf, Casp9, Bax, Bak y componentes del complejo de citocromo C (verde), mientras que proteínas anti-apoptóticas como Bcl2 y Bcl2l11, Braf, Birc6 o Cyr61 incrementan su expresión (rojo).

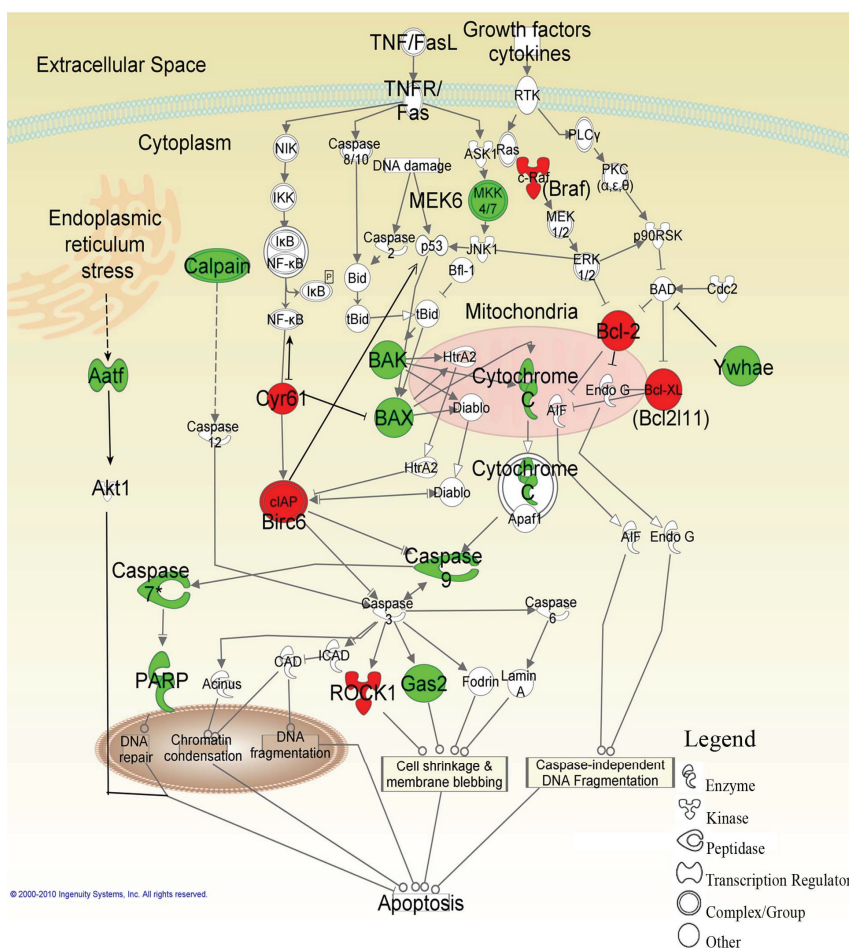


Figura 27. El óxido nítrico regula las vías de señalización de apoptosis. A partir de los datos de microarray de los genes involucrados en apoptosis se generó esta vía de señalización, usando la herramienta Core Pathways Analysis y modificada con Path Designer en el paquete informático IPA. Leyenda: Rojo: Genes inducidos; Verde: Genes reprimidos.

Por otro lado, el ciclo celular de las CMEs sostiene la replicación y la transmisión de información genómica hacia las células de la progenie. Existen diversas evidencias de que la regulación de la progresión del ciclo celular/proliferación está comprometida con los procesos diferenciadores. El tratamiento con bajas concentraciones de NO modifica la expresión génica de 52 genes del ciclo celular como se

Heatmap showing the expression of 48 genes in two conditions: - LIF + 2µM DETA-NO (top) and - LIF (bottom). The color scale ranges from 1.3 (green) to 10 (red).

Genes (columns):

- Parp1
- Acl1
- Banf1
- Creb1
- Cnfl
- Bax
- Ywhae
- Dnmt1
- Pkd2
- Cyr61
- Cdk2
- Ceng2
- Px11
- Ptgi
- Cacph1
- Aurkb
- Mia2
- Tefc2a
- Tk1
- Sept9
- Ikzf3
- Khdrbs1
- Pola1
- Bcl2
- Nosl
- Map2k7
- Neurod1
- Mxd4
- Rfxmt1
- Mxd4
- Dnae2a
- Braf
- Atf2
- Tef712
- Ssbp2
- Cdk6
- Pbrm1
- Hipk2
- Cdkn2d
- E4f1
- Nek6
- Ddb2
- Dcc5b
- Cnfrab
- Sd2
- Rad51l3
- Casp9
- Rara
- Map2k6
- Polh
- Mxd3
- Vhnh

Conditions (rows):

- LIF + 2µM DETA-NO
- LIF

Color scale: 1.3 (green) to 10 (red).

0.05) cuando fue comparada con respecto a las células cultivadas en presencia de LIF (Figura 29A).

Muchos de los productos de los genes expresados diferencialmente por el NO mostrados en la Figura 28 actúan como puntos de control del ciclo celular, así por ejemplo: Mxd3, Mxd4, Mxi1, Aurkb, Ccng2, Cdc25b y Cdc25c, se conoce que poseen un papel importante en la regulación de la transición G2/M y en la citocinesis, mientras que Cdk6, Cdk2, Pttg1, E4f1 participan en la transición G1/S.

Estos resultados sugieren que el NO podría estar regulando el ciclo celular. Para estudiar esto, realizamos ensayos de progresión del ciclo celular usando tinción con yoduro de propidio y mediciones del contenido de ADN por citometría de flujo. Estos ensayos se llevaron a cabo en células R1/E sincronizadas en fase G2/M con 400nM de nocodazol y luego liberadas en medio de cultivo y tratadas con 2 μ M de DETA-NO por 24 horas. En las células expuestas al NO el 51% sufrieron una detención en la fase G2/M en comparación con el 41 y 42% de las células diferenciadas e indiferenciadas respectivamente.

Consecuentemente se observó la disminución de la fase S mientras que no hubo una diferencia significativa de la fase G1 (Figura 29 B). En conjunto estos resultados sugieren que bajas concentraciones de NO regulan negativamente la proliferación celular y bloquean a las CMEs en la fase G2 a través de la regulación transcripcional de los genes que actúan sobre este punto de control.

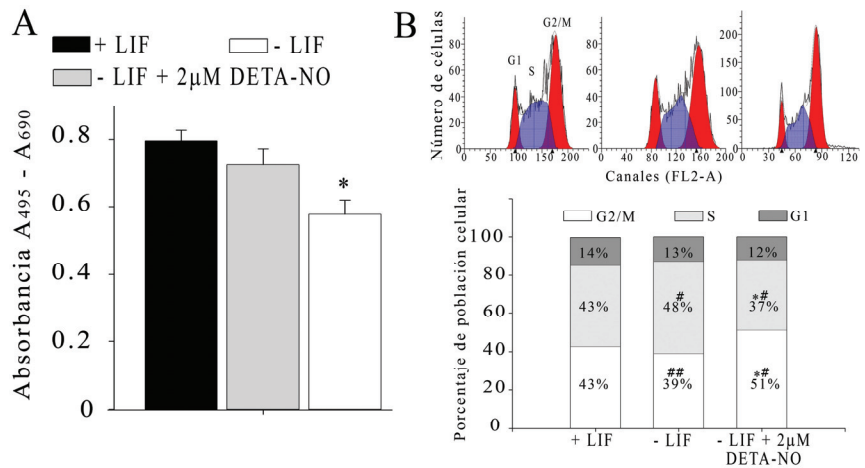


Figura 29. El óxido nítrico disminuye la proliferación celular y bloquea el ciclo celular en la fase G2/M de las CMEs de ratón. **A.** Análisis de proliferación celular usando ELISA Cell proliferation kit, midiendo la incorporación de BrdU en células cultivadas en presencia y ausencia de LIF y tratadas con 2 µM de DETA-NO. La medición se hizo 8 horas después de la adición del BrdU. **B.** Análisis del ciclo celular por citometría de flujo de las células D3 silvestres sincronizadas en G2/M, liberadas por 24 horas con el tratamiento con NO, y luego marcadas con Ioduro de propidio. La intensidad de la fluorescencia fue medida usando el citómetro FACScan y analizados con el programa ModFit LT v3.0 (RCS <3). Ratio G2/G1~ 1.8.

IV.12 Impacto del óxido nítrico sobre la actividad transcripcional de genes de desarrollo, diferenciación y remodelación de la cromatina.

Las CMEs de ratón permanecen no diferenciadas *in vitro* cuando son cultivadas en presencia de LIF. El cultivo de las CMEs en ausencia de LIF, resulta en la generación de poblaciones heterogéneas de células con fenotipos diferenciados. Nuestras observaciones demuestran que el tratamiento con bajo NO promovió la regulación transcripcional de genes asociados con autorrenovación y diferenciación (Tabla 7). Entre ellos encontramos genes que

incrementan su expresión como Bcl2, Pbx1, Pou2f2, Bmpr1a; y genes que disminuyen su expresión como Clec11a, Stat5b, Tcf3 y Rara, que pueden contribuir a prevenir la salida del estado de no diferenciación. Alternativamente, las células cultivadas en ausencia de LIF expresaron genes relacionados con linaje mesodermal (Ctnnbip1, Itgam, Dock1) y ectodermal (Fgf11, Nr1d1, Nestin) (Tabla 8).

Las células tratadas con NO expresan también genes relacionados al desarrollo embrionario y diferenciación tales como receptores de membrana (Robo2, Gnaq y Agtr1), proteínas secretadas al espacio extracelular (Wnt4, Lamb1, Prlr, Fras1, Tnfsf9) y un grupo considerable de proteínas nucleares como algunos TFs (Zbtb16, Tbx6, Arntl, Smad7, Nfix, Sox9, Dmrt1, Ttp73) y enzimas para modificaciones de proteína y ADN (Mxd1, Hist1h1e, Ctsd, Qki, Bmi1, Satb2, Zfp3, Rorb1, Hoxc6). Aunque los genes mencionados anteriormente están involucrados en eventos de desarrollo, ellos no son considerados como marcadores específicos de linaje.

En síntesis, bajas concentraciones de NO promueven la expresión mayoritaria de genes de autorrenovación y la expresión reducida de genes de diferenciación. Así como la expresión de un importante número de genes involucrados en procesos de diferenciación pero aparentemente no relacionados a linaje celular específico.

Es interesante observar la expresión enriquecida de 39 genes involucrados en la formación de complejos activadores/represores y de remodelación de cromatina en las CMEs tratadas con bajo NO. La

Figura 30 A muestra el mapa de calor de estos genes. En general, la regulación de la estructura de la cromatina puede ser a distintos niveles: i) Regulación de la expresión y la actividad de proteínas que modifican la metilación de ADN; ii) Regulación de la expresión de proteínas que forman parte de la cromatina; y iii) Regulación de la expresión y la actividad de proteínas que modifican postraduccionalmente las proteínas que conforman la cromatina.

Respecto a las proteínas de tipo i, en las células tratadas con NO la expresión de la *DNA methyltransferase de novo (Dnmt3b)* está incrementada y la expresión de la *DNA methyltransferase de mantenimiento (Dnmt1)* está disminuida. Asimismo, la expresión de *Gadd45b*, proteína que interactúa con componentes de los complejos de metilación de ADN y con un papel en la demetilación de promotores específicos en diferenciación neuronal, está disminuida. El papel de estas proteínas en la regulación génica de la transición de la pluripotencia y diferenciación ha sido ampliamente revisado [64, 65]. Otras proteínas de unión a sitios CpG metilados como: *Mbd5* y *Mbd3l2*, se encontraron reguladas positivamente (Figure 30 A).

Los niveles de expresión de histonas y sus modificaciones post-traduccionales son indicadores del estado de la estructura de la cromatina en una región determinada del genoma y regulan la activación y represión génica durante el desarrollo. En la misma secuencia de lo descrito arriba, el tratamiento con NO produce la disminución significativa de su expresión a nivel de ARNm de proteínas del tipo ii, como la histona H4 (*Hist1h4i*), histona H2a (*Hist3h2a*) e histona H2b (*Hist2h2be*, *Hist1h2bc*).

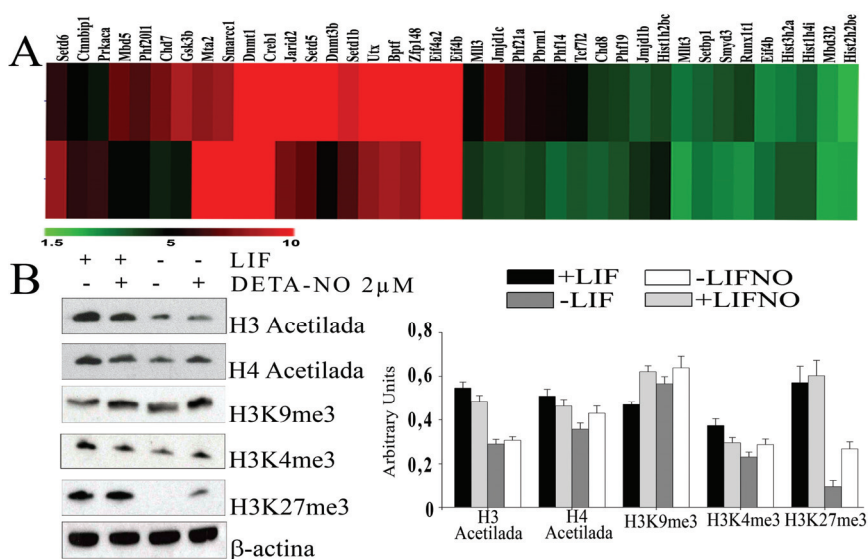


Figura 30. Cambios en la estructura de la cromatina son promovidos por el óxido nítrico en las CMEs de ratón. **A.** Mapa de calor de los 39 genes relacionados con expresión génica y remodelación de la cromatina en las CMEs D3-pOct4-eGFP, cultivadas en la ausencia de LIF y aquellas tratadas con NO. Leyenda: Rojo: Genes inducidos; Verde: Genes reprimidos. **B.** Western blots de las histonas modificadas y gráfico de barras de las densitometrías correspondientes.

En el caso de proteínas de tipo iii, hemos observado la regulación positiva de ciertas metil transferasas como: Jarid2, Mll3, Mllt3, Setd1b y Smyd3 que podrían estar involucradas en ciertas modificaciones de histonas, y podrían formar parte de las acciones epigenéticas del NO (Figure 30 A). Además, bajas concentraciones de NO incrementan la acetilación de la histona H4, pero no promueve ningún cambio en la acetilación de histona H3. Adicionalmente el NO alteró ligeramente el patrón de tri-metilación de la histona H3 en las lisinas 4, 9 y 27 (Figure 30 B).

Basados en estos resultados decidimos evaluar si estas modificaciones podrían estar involucradas en la autorrenovación y

diferenciación. Para ello realizamos ensayos de inmunoprecipitación de cromatina con la finalidad de evaluar si las proteínas H3K4me3, H3K9me3 y H3K27me3 están asociadas con regiones reguladoras de los genes *Nanog*, *Oct4* y *Brachyury* en nuestras condiciones experimentales. Nuestros resultados mostraron que el NO incrementa la ocupación de la marca activadora, tri-metilación en la lisina 4 de la histona H3, sobre los promotores de *Nanog* y *Oct4*, mientras que la ocupación de la marca represiva, tri-metilación de lisina 9 de la histona H3, está disminuida respecto a la condición control (células cultivadas en ausencia de LIF, condición que promueve la diferenciación) (Figura 31 A y B). Aunque la tri-metilación en lisina 27 es ligeramente superior con el tratamiento que con la condición control, parece ser que esta ocupación no es relevante para el silenciamiento de ambos genes, en su lugar podría estar influyendo en la eficiencia de su expresión, que siempre es inferior a aquella de los controles no diferenciados (Figura 31 D y E).

Brachyury, es un gen de diferenciación hacia meso-endodermo que se expresa tempranamente y que aparece tres días después del cultivo en ausencia de LIF. El tratamiento con NO disminuyó notablemente la expresión de este gen (Figura 31 F). El análisis de inmunoprecipitación de cromatina para el promotor de *Brachyury* mostró una ocupación por histona H3 tri-metilada en Lys 4, Lys 9 y Lys 27 (Figura 31 C). Es probable que el control de este gen por el NO podría deberse al balance de los niveles de metilación de la histona H3 tri-metilada en Lys 4 y Lys 27 en un “dominio bivalente” en contraste con la ausencia de Lys4 y la alta ocupación para la Lys 27 en células no diferenciadas. Adicionalmente, la presencia de tri-metilación en Lys 9

podría ser sinérgica para la represión de este gen después del tratamiento con NO.

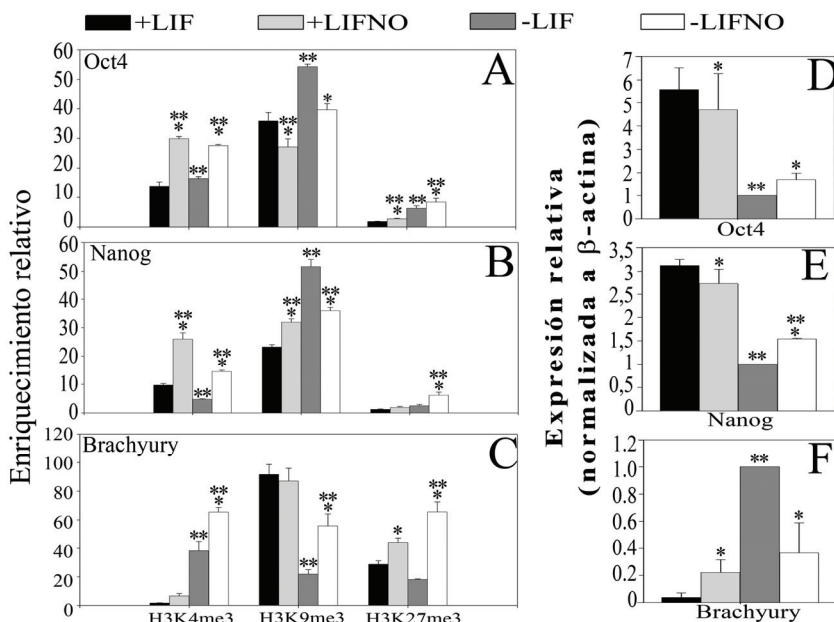


Figura 31 El óxido nítrico promueve cambios a nivel epigenético sobre la regulación de genes de pluripotencia y diferenciación en las CMEs de ratón. Ensayos de Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) realizados con cromatina extraída de células R1/E. El ADN inmunoprecipitado con histonas modificadas, fue analizado con PCR en tiempo real para la detección de los segmentos promotores proximales para Oct4, Nanog y Brachyury, los gráficos representan el nivel de enriquecimiento de la ocupación de los promotores (A, B y C). Valores de expresión génica para Oct4, Nanog y Brachyury relacionado con la ocupación de sus promotores por las histonas modificadas (D, E y F)

Finalmente, otras proteínas que cumplen un papel en la remodelación de la cromatina y que se encuentran expresadas diferencialmente incluyen: i) El gen crebbp (CBP/p300), el cual notablemente se incrementa con el tratamiento. ii) Smarcc1/Baf155, una proteína componente del complejo remodelador de cromatina involucrado en la represión de Nanog a partir de la diferenciación de las CMEs. iii) Miembros de la familia de proteínas con dominio “dedos PHD” tales como: Phf14, Phf19, Phf2011, Phf21a y Pbrm1, todos ellos

que codifican para componentes del complejo BRAF-HDAC (BHC), así como también Bptf, la subunidad más grande del factor de remodelación del nucleosoma. iv) ADN helicasas Chd7 y Chd8 que funcionan como represores transcripcionales a través de la remodelación de la estructura de la cromatina incrementan su expresión. v) Mta2 un componente del complejo de remodelación de nucleosoma por actividad deacetilasa (*NuRD*) está regulado negativamente

IV.13 El efecto del óxido nítrico sobre la autorrenovación y pluripotencia favorece la conexión de genes del metabolismo mitocondrial-muerte celular y respuesta similar a hipoxia.

Las redes biológicas se han convertido en herramientas esenciales para el análisis e interpretación de grandes grupos de datos generados por tecnologías a gran escala (*high throughput technology*). En general, una red es definida por un conjunto de distintos elementos (nodos) y las interacciones entre los elementos que la componen (interconectados a través de líneas). Aplicando este concepto en biología, los nodos pueden representar genes, proteínas o estructuras modulares las cuales son una combinación de múltiples unidades co-dependientes. Las líneas que representan las interacciones, conectan los nodos y forman una red funcional que gobierna los procesos celulares [66].

Los estudios de transcriptoma en plataformas de *microarrays*, son actualmente soportados por programas informáticos que permiten

observar el efecto del tratamiento con ciertas moléculas sobre determinados tipos celulares, y como afecta la expresión de ciertos genes clave y, como sus productos pueden interaccionar y formar una red que tendrá un efecto sobre una función biológica determinada. El análisis de nuestros datos obtenido con el paquete informático IPA, generó 19 redes con un *score* y un *p-value* significativos tomando en cuenta moléculas centrales desde las cuales se despliegan otros genes con los que interactúan para afectar una función determinada. Posteriormente se buscó la mayor interacción entre estas redes, considerando las categorías funcionales y el número de moléculas que las componen. Así encontramos una red que consiste de 84 moléculas que permitieron la identificación de tres nodos centrales. Los genes: Erk, Cytochrome C y Vhl fueron los que mostraron más alta conectividad con otros genes y formaron así tres sub-módulos en la red principal.

En la figura 32 se puede observar la red generada a partir de la fusión de cuatro redes menores. En primer lugar, Erk es una molécula que pertenece a la vía de señalización de las MAP quinasas (Erk1/2) y ha sido implicada en la regulación de la autorrenovación de las CMEs de ratón a través de la fosforilación de Klf4 [67]. En nuestras condiciones experimentales la expresión de Erk no se encontró afectada por el NO, pero apareció como molécula central y altamente conectada a algunos componentes de la vía Erk/Mapk (Spred1, Tnip2, Tacc1, Stat5a/b, Stat, Stat2 y Stat6) que si se encontraron regulados por el tratamiento, confirmando que una de las vías principales de mantenimiento de la autorrenovación podría estar modulada por el NO. Otra molécula central está compuesta por Citocromo c y otros genes de

las subunidades implicados principalmente en muerte celular, respuesta a estrés oxidativo y permeabilidad de la membrana mitocondrial (Cyt C, Cox8A, Cox7A, Cox6B2, Vdac, Casp9, Birc6, Bcl2l11, Maff, Bax, Prkar1a), algunos de ellos participan en eventos metabólicos en la mitocondria tales como en: reacciones de glutation (Gpx4, GSR) o biogénesis mitocondrial (Nrg1).

La tercera molécula central, que mostró un comportamiento bastante interesante y que no hubiese sido posible ver sin ayuda de esta herramienta fue Vhl (*Von hippel-lindau*), proteína reguladora del factor inducible por hipoxia (Hif-1). Los genes que interaccionan con este gen han sido encontrados modulados durante la respuesta a hipoxia, algunos de ellos son reguladores de la transcripción como: Mxi1, Tceb2, Rnf10, Hnrnp y Cstf3, así como también genes relacionados a procesos de ubiquitinación (E3 Ring y Ube2k). Por esta razón decidimos buscar otros genes que puedan estar relacionados con actividad de respuesta a hipoxia que podrían verse regulados por el NO durante el tratamiento en las CMEs de ratón. La tabla 9 enumera a los 31 genes encontrados así como sus valores de expresión relativa. Es evidente que un estudio más profundo sobre el papel del NO y su implicancia en la respuesta similar a hipoxia es recomendado.

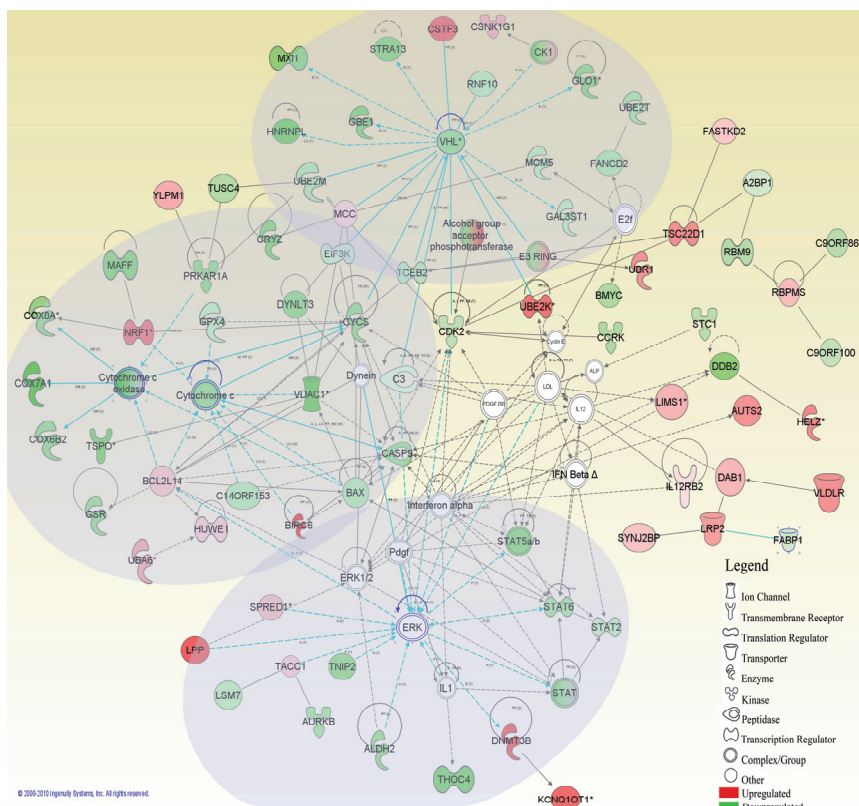


Figura 32. Red genética de interacción funcional compuesta por 84 genes afectados durante el tratamiento con NO. La red es la representación de la función de tres redes principales y es gráficamente desplegado como moléculas centrales (genes altamente interconectados) y las líneas de interconexión (genes relacionados con moléculas centrales). Las redes fueron generadas con la herramienta IPA. Leyenda: Rojo: Genes inducidos; Verde: Genes reprimidos.

Discusión

V. Discusión

Efecto del óxido nítrico sobre la fisiología de las CMEs.

Las células madre embrionarias y aquellas de pluripotencia inducida han sido consideradas como una fuente de células no diferenciadas que podrían ser usadas en el tratamiento de enfermedades metabólicas y degenerativas, como la diabetes, enfermedad de Parkinson, anemia de Fanconi etc. Una mejor comprensión sobre los mecanismos por los cuales estas células mantienen su pluripotencia y se diferencian en cualquier tipo celular funcional proporcionará información valiosa en el campo de la biología celular básica, e incrementará su potencial en medicina regenerativa.

En la literatura se encuentran estudios que describen que diversas señales exógenas alteran la susceptibilidad de las CMEs a autorrenovarse o diferenciarse. Incluso, se ha descrito que el destino final de las células puede ser generado por la integración bioquímica de señales complementarias y/o antagónicas [68]. El factor inhibidor de leucemia (LIF) es un factor importante en el mantenimiento de la autorrenovación de las CMEs de ratón. El mecanismo de acción del LIF implica su interacción con el receptor de LIF y la proteína gp130 para activar una vía de señalización que da como consecuencia la fosforilación de la proteína Stat3 a través de la Jak quinasa [68, 69].

En las CMEs humanas, el LIF no es un factor importante, debido a que estas células no presentan receptor de LIF. Estas células originalmente han sido derivadas y mantenidas en medios conteniendo suero fetal bovino (FBS), sin embargo su utilización en terapia celular

pasa por eliminar todo rastro de contaminación de origen animal. La tendencia actual en su mantenimiento y expansión es emplear medios de cultivo libres de suero ya sea suplementados con soluciones sustitutos de suero y/o factores de crecimiento. Diversos estudios han descrito que el factor más importante en el mantenimiento de la pluripotencia de estas células es el Factor de Crecimiento de los Fibroblastos básico (bFGF). A pesar de estas modificaciones, las condiciones de cultivo para el mantenimiento rutinario de las CMEs permanecen subóptimas debido a que se diferencian espontáneamente después de numerosos sub-cultivos [10]. Así, es un hecho que la modificación de las concentraciones de estos factores críticos podría determinar el equilibrio entre autorrenovación y diferenciación. Por esta razón se requiere una mejor comprensión cuantitativa acerca del papel que las señales moleculares exógenas juegan en la determinación del destino de las células con algún grado de potencialidad durante sucesivas divisiones mitóticas [70, 71].

Hasta la fecha, existe un conocimiento limitado de los mecanismos que utilizan los factores extrínsecos para regular el mantenimiento de la autorrenovación/pluripotencia y la diferenciación. Se han estudiado un número limitado de compuestos químicos que afectan el comportamiento de las CMEs. Adicionalmente, se están realizando una serie de estudios de cribado de alto rendimiento (*high throughput screening*, *HTS*) para encontrar moléculas químicas que actúen como moduladores apropiados para dirigir el crecimiento y diferenciación de las CMEs. El objetivo final de estos estudios es la exploración de los mecanismos de acción de estos compuestos sobre la maquinaria de autorrenovación y diferenciación [72, 73].

Recientes estudios muestran que el LIF no es suficiente para sostener la autorrenovación de las CMEs de ratón, y que requiere de señales adicionales como por ejemplo las señales activadas por proteínas morfogénicas del hueso (*bone morphogenic proteins BMPs*) activadoras de genes inhibidores de diferenciación (Id) [74, 75]. Por esta razón toman relevancia las investigaciones que contribuyan a un mejor entendimiento de los mecanismos de modulación y comunicación entre moléculas exógenas y el circuito de factores de transcripción que mantienen el estado de autorrenovación/pluripotencia, así como las vías de señalización que median estos procesos.

En este sentido, la literatura muestra una serie de estudios llevados a cabo con moléculas como el ácido retinoico, un metabolito derivado del retinol, que se encuentra asociado con procesos diferenciadores durante el desarrollo embrionario y fetal. En CMEs de ratón, el retinol previene la diferenciación a través de mecanismos independientes del ácido retinoico, evitando llevar a cabo cultivos prolongados con células nodrizas (*feeder layers*). Las células tratadas con retinol son capaces de expresar Oct4, Sox2 y Nanog, reteniendo su completo potencial para diferenciación hacia las tres capas germinales y la formación de quimeras. Esta aplicación ha sido comprobada recientemente también para células iPS [74, 76-78].

Otra vía de señalización importante que ha sido considerada como diana de fármacos para el mantenimiento de la autorrenovación ha sido la vía de Wnt. Se ha demostrado que la activación de esta vía puede ser suficiente para mantener la autorrenovación de CMEs de

ratón y humanas, mientras que la vía es inactivada durante la diferenciación. La activación puede ser llevada a cabo por ejemplo con un inhibidor farmacológico específico de la glicógeno sintasa quinasa 3 (GSK-3) llamado BIO (6-bromoindirubin-3-oximo). Las células tratadas con este fármaco mantienen el fenotipo indiferenciado en ambos tipos de CMEs y sostienen la expresión de factores de transcripción específicos del estado pluripotente Oct3/4, Rex1 y Nanog [79].

En este contexto, durante las últimas décadas el NO ha sido descrito como una molécula de señalización que regula la supervivencia y proliferación de diversos tipos celulares [80-82]. Además de haber sido encontrado afectando la expresión génica a nivel de la transcripción y la traducción [54]. El papel del NO como molécula de señalización durante el desarrollo ha sido demostrado en *Xenopus* y *Drosophila*, algunas de estas vías comprenden básicamente regulación sobre la proliferación y el movimiento celular y sus acciones mayormente independientes de GMP cíclico [27, 28].

La propuesta que se desprende de la presente tesis pasa por demostrar el papel de las bajas concentraciones de NO en el mantenimiento de la autorrenovación, en contraposición al papel de las altas dosis propuesto por nuestro grupo y por otros en la transición hacia la diferenciación [30, 47, 48]. Es ampliamente conocido que el NO es producido por las isoformas de la óxido nítrico sintasa que son expresadas en tejidos embrionarios y recientemente en CMs [35, 52], por lo que es comprensible encontrarlas involucradas en la regulación de algunos procesos biológicos de las CMEs. De esta manera podemos

encontrar que la eNOS y la nNOS producen niveles homeostáticos de NO y que la iNOS produce altos niveles de NO que pueden estar relacionados con procesos inflamatorios y para el caso de CMs, en inducción de diferenciación celular [41].

En nuestro estudio de la expresión de las isoformas de NOS, cuando las CMEs de ratón fueron cultivadas bajo condiciones óptimas de no diferenciación en presencia de LIF, se observaron altos niveles de expresión de eNOS y una ligera expresión de nNOS. Cuando las células fueron sometidas a dos ensayos de diferenciación, que comprenden cultivos en adherencia y cultivos para la formación de cuerpos embrionarios, ambos en ausencia de LIF, se observó que la expresión de eNOS disminuyó considerablemente; mientras que la expresión de iNOS aumentó significativamente. Respecto a la expresión de la nNOS esta sólo aumentó considerablemente en el protocolo de diferenciación por formación de cuerpos embrionarios. Estos cambios de expresión de las isoformas de NOS podrían contribuir al mantenimiento del equilibrio de producción de NO necesarios para establecer un punto de control en la transición desde autorrenovación hacia diferenciación y que de alguna manera pueda ser dependiente de NO. (Figura 5 A).

La transición desde el estado no diferenciado al diferenciado en las CMEs de ratón está relacionada con la expresión de las isoformas de NOS y con componentes de la vía de señalización del NO como lo demostramos por nuestros resultados con respecto a los niveles de expresión para eNOS (Figura 5 B), en los cuales observamos que durante la diferenciación espontánea inducida por la retirada de LIF del

cultivo, la expresión de eNOS va disminuyendo gradualmente y la expresión de iNOS se incrementa notablemente a partir del quinto día. Estos resultados son apoyados por los trabajos del grupo de Ferid Murad en Houston, Texas. Este grupo reporta que las CMEs no diferenciadas expresan altos niveles de ARNm de eNOS y de subunidad $\beta 1$ de la Guanilato Ciclasa (GCs $\beta 1$). Cuando las células se diferencian, la eNOS disminuye abruptamente y la GCs $\alpha 1$ y la GCs $\beta 1$ se incrementan gradualmente después de algunos días [36, 45, 46]. Krumenacker y Murad encontraron que a partir de la diferenciación de cultivos de CMEs en suspensión por gota colgante, los niveles de eNOS disminuyeron, mientras que los niveles de iNOS, nNOS, GCs $\alpha 1$ y la GCs $\beta 1$ se incrementaron significativamente, lo cual refleja la importancia de las isoformas de NOS como componentes de señalización integrales en las CMEs durante la diferenciación y desarrollo [46], reafirmando así nuestros resultados para nuestro modelo propuesto.

La producción de NO podría estar relacionada con la dinámica de la expresión de estas isoformas, como se muestra en nuestros experimentos con: donadores de NO, sistemas de sobreexpresión de eNOS, y el tratamiento con inhibidores de la enzima (Figura 6 A y 6 B). Cabe destacar en este punto, que durante el presente estudio del transcriptoma de las CMEs de humanos y de ratón no se han encontrado cambios significativos en la expresión de componentes de la vía de señalización del NO-dependiente de GMPc.

Otros trabajos sugieren que la producción de NO derivada de iNOS es importante para la diferenciación hacia cardiomiocitos desde

las CMEs y es probable que este en relación con la producción de altas concentraciones de NO similares a las utilizadas en los protocolos de diferenciación con altas concentración de donadores de NO o mediante la sobreexpresión del gen de la iNOS en CMEs [30, 33].

La generación de una línea celular que exprese proteína verde fluorescente (GFP) bajo el control del promotor del gen de pluripotencia Oct4 es una estrategia que nos ha permitido seleccionar aquellas células con una alta expresión de esta proteína y por lo tanto con una morfología de colonia propia de las CMEs (Figura 7 A). Además, esta línea D3-Oct4-GFP fue transfectada con un vector que lleva el gen de la eNOS. Las células de esta línea D3-Oct4-GFP-eNOS tienen un mayor desplazamiento de la curva de intensidad de fluorescencia con respecto a la línea D3-Oct4-GFP (Figura 7 B), esto probablemente debido a que la sobreexpresión de eNOS, estimula una mayor expresión del gen de Oct4 como se aprecia también por los resultados de PCR cuantitativa (Figura 8 A y 11 A).

Estas dos líneas celulares fueron caracterizadas también por: identificación de su cariotipo (Figura 8 C) y la expresión de otros marcadores moleculares como Nanog, Sox2 y Tert, siendo mayor la expresión de estos genes en las dos líneas transfectadas con respecto a la línea silvestre (Figura 8 A). La notable expresión de Tert en la línea D3-Oct4-eNOS sugiere que el NO podría tener un efecto sobre la actividad de la enzima telomerasa y la longitud del telómero. La Figura 8 B muestra como las líneas transfectadas tienen una mayor actividad de esta enzima que la línea silvestre, que a su vez está relacionada con la mayor expresión génica mostrada, sugiriendo un papel relevante en

el mantenimiento del estado no diferenciado de las CMEs, tal y como es refrendado por diversos estudios publicados en los últimos años, donde se evidencia la relación de la expresión de eNOS y la producción de óxido nítrico con la actividad de la telomerasa con su consecuente efecto sobre el retraso de la senescencia en otros modelos celulares [83, 84], así también en co-cultivos de células madre neuronales y neuronas la activación de la telomerasa de estas últimas, a través de la acción de la nNOS, puede inhibir la diferenciación y la proliferación de las primeras [85].

En ese sentido, los resultados presentados en esta tesis, demuestran que la expresión de las isoformas y la consecuente producción de NO tienen un papel sobre la biología de las CMEs. Concretamente las células que expresan altos niveles de eNOS mantienen una morfología y un estado no diferenciado, así como una elevada actividad telomerasa. Y en aquellas células cultivadas en condiciones de diferenciación la expresión de iNOS se incrementa conforme pasan los días, rompiendo el equilibrio hacia la entrada de la diferenciación. Estos datos confirmarían que la transición hacia la diferenciación es sensible a las concentraciones de NO.

Durante el cultivo de las CMEs bajo condiciones estándar se producen estados de diferenciación espontánea propios de poblaciones heterogéneas. Uno de los objetivos de nuestro estudio fue determinar el efecto de las bajas concentraciones de óxido nítrico sobre la regulación de la expresión génica en los procesos relacionados con la pluripotencia, y su contribución para mejorar las condiciones de cultivo preservando la capacidad de autorrenovación de las CMEs.

Como se ha comprobado, las CMEs no diferenciadas expresan eNOS, aunque la producción de NO no es suficiente como para retrasar la diferenciación espontánea por si sola. Por esta razón decidimos realizar ensayos de dosis dependencia con el donador de NO DETA-NO. Las concentraciones entre 2 y 20 μM de DETA-NO mantienen altos los niveles de expresión de marcadores como Oct4 y Nanog tanto en presencia como en ausencia de LIF, mientras que la expresión disminuye con 50 μM del donador (Figura 9 A). Estas mismas concentraciones mantuvieron la expresión de marcadores tempranos de diferenciación a niveles más bajos que los cultivos control en ausencia de LIF y sin NO, aunque la expresión de marcadores como FGF 5 y 8 disminuyeron considerablemente con 50 μM del donador (Figura 9 C).

Las imágenes de microscopía de la tinción para fosfatasa alcalina (FA), un marcador de autorrenovación ampliamente utilizado, muestran como el número de colonias positivas para FA es significativamente mayor en las células tratadas con 2 μM de DETA-NO, pero empieza a disminuir conforme se incrementó la concentración del donador (Figura 9 B). Es importante anotar que el menor número de colonias FA positivas puede deberse a que la supervivencia también disminuye al incrementar las concentraciones del donador como se aprecia en la Figura 13 A.

El mismo efecto es observado al analizar por citometría de flujo la expresión de GFP bajo control del promotor de Oct4 en las células que sobreexpresan eNOS, el porcentaje de células que expresan GFP es mayor en las células que sobreexpresan eNOS en ausencia de LIF (51.8%), que en aquellas silvestres (27.7%). Mientras que la inhibición

de la actividad enzimática de eNOS disminuyó el porcentaje de células GFP⁺ hasta 16.4%, confirmando que la producción de NO es importante para la actividad regulatoria del promotor de Oct4 (Figura 10). La expresión de otros marcadores de autorrenovación y diferenciación también fue afectada positivamente (Figura 11 y 12).

A partir de estos experimentos y aquellos de dosis dependencia, pudimos determinar que la concentración más óptima de NO exógeno con un efecto compensatorio sobre la autorrenovación y la pluripotencia es 2 μ M para el donador DETA-NO. Estos resultados son apoyados por otros estudios en los que se encontraron que, determinadas respuestas celulares precisas fueron reguladas diferencialmente por concentraciones de NO específicas. De esta manera, se ha encontrado que bajas concentraciones de NO regulan procesos fisiológicos normales y los altos niveles tales como aquellos esperados en macrófagos a través de la activación de la iNOS pueden tener función citotóxica/citostática [41, 86]. De estas evidencias se desprende nuestra propuesta de que la generación de NO a niveles bajos y sostenidos podrían ser un instrumento adecuado para el mantenimiento de la pluripotencia [40].

Una función importante en la regulación del mantenimiento de la pluripotencia es la regulación de muerte celular. A pesar de que el efecto sobre la regulación de la apoptosis del NO ha sido ampliamente discutido en otros modelos celulares, en las CMEs aun no se conoce completamente. Como se ha mencionado previamente, el NO puede producir diversos efectos dependiendo de su concentración y disponibilidad. Una sobreproducción duradera de NO actúa como un

mediador pro-apoptótico por activación de proteasas de la familia de las caspasas después de la liberación de citocromo c mitocondrial al citosol, la regulación positiva de la expresión de p53, y finalmente la regulación de la expresión de proteínas asociadas a apoptosis, incluyendo proteínas de la familia Bcl. Por otro lado, concentraciones bajas o fisiológicas de NO protegen a las células de la apoptosis inducida por la retirada de factores tróficos: Fas, TNF α /ActD, y LPS. Este mecanismo anti-apoptótico es mediado por la transcripción de genes protectores incluyendo proteínas de choque térmico: hemoxigenasa y ciclooxigenasa-2 [60].

La homeostasis celular es mantenida a través de un balance entre proliferación y muerte celular. El NO puede alterar este balance ya que puede promover o inducir acción sobre ambas funciones. Las alteraciones de este balance pueden contribuir a la patogénesis de un número de enfermedades humanas. Por ejemplo la apoptosis mediada por altas concentraciones de NO resulta en enfermedades humanas severas como: diabetes, aterosclerosis, esclerosis lateral amiotrófica y desordenes neurodegenerativos. Así, la regulación de la producción de altas concentraciones de NO es un blanco terapéutico pertinente para varias enfermedades que involucran apoptosis [87]. Por otro lado, la producción de cantidades apropiadas de NO tienen un efecto positivo, suprimen la muerte celular apoptótica, previniendo el desarrollo de enfermedades hepáticas o apoptosis de células endoteliales y otros modelos celulares.

Nuestros resultados de los estudios de dosis dependencia, sobre la fragmentación de ADN, con un donador de NO sobre las CMEs de

ratón de la línea D3-Oct4-GFP, presentan un mayor efecto protector hasta 20 μ M en presencia de LIF y de 10 μ M en ausencia de LIF (Figura 13 A). Las líneas transfectadas D3-Oct4-GFP y D3-Oct4-GFP-eNOS no presentan un cambio significativo en el porcentaje de fragmentación de ADN durante el cultivo en presencia de LIF, mientras que para las células de la línea D3-Oct4-GFP-eNOS cultivadas en ausencia de LIF el porcentaje de fragmentación de ADN es notablemente más bajo que aquellas células de la línea D3-Oct4-GFP. Esta última, presenta un porcentaje menor de fragmentación de ADN que la línea silvestre (Figura 13 B). Este efecto tiene su explicación en el tiempo de entrada a diferenciación de las células de esta línea, ya que debido al proceso de separación por “*cell sorting*” a través de la expresión de GFP, las células que expresan alto GFP, poseen altos niveles de expresión de Oct4 y de otros genes importantes involucrados en control de la pluripotencia, además presentan resistencia a diferenciarse espontáneamente, [88, 89]. Por lo tanto, al tener un retraso en la entrada hacia diferenciación, la activación de los programas apoptóticos se verán afectados. La autorrenovación de las CMEs no diferenciadas requiere de señales que mantienen el balance entre la proliferación y la inhibición de la apoptosis así como de la diferenciación. Es probable que la regulación de algunos genes relacionados con apoptosis sean regulados por el oncogén cMyc de una manera independiente de p53 [90, 91].

Con respecto a la expresión de genes que podrían afectarse por el NO y que estén involucrados con el proceso apoptótico, observamos que los genes pro-apoptóticos como Caspasa 7 y Caspasa 9, Bax y Bak, genes involucrados en la liberación de citocromo c desde la

mitocondria y la activación de la apoptosis; disminuyen su expresión significativamente. Mientras que genes anti-apoptóticos como: Birc6, un inhibidor de p53 en apoptosis mitocondrial, y algunos de la familia Bcl (Bcl-2, Bcl2l1) incrementan notablemente su expresión (Figura 13 C). Igualmente, pudimos comprobar que la actividad de caspasa 3 sobre su principal diana PARP se encuentra bloqueada después del tratamiento con 2 μ M de DETA-NO (Figura 13D). Es probable que el NO actúe bloqueando la apoptosis dirigida desde la mitocondria, ya que como se ha mostrado, la actividad de las caspasa 3 se encuentra disminuida, y la expresión de genes pro-apoptóticos que actúan a través de la mitocondria están regulados negativamente tal y como se representa en la Figura 26.

En general nuestros resultados sugieren que la regulación de la apoptosis dependiente de la mitocondria en las CMEs es un mecanismo de acción del NO. En la apoptosis mitocondrial, la regulación de la liberación de factores apoptogénicos (cytochrome *c*/Apaf1/caspase 9 apoptosoma y AIF/apoptosis nuclear) está regulado por el balance de los niveles de proteínas de la familia Bcl-2. Niveles reducidos de Bcl2 y niveles altos de Bax/Bad/Bid disminuyen la integridad de las membranas mitocondriales y al contrario niveles altos de Bcl-2 incrementan la integridad de la membrana mitocondrial protegiendo a las células de la apoptosis [92]. La importancia de que el tratamiento con 2 μ M de DETA-NO promueva un efecto anti-apoptótico a través de la sobreexpresión de Bcl-2, es soportada por estudios que demuestran que las CMEs de ratón que sobreexpresan Bcl-2 poseen mejor expresión de marcadores de autorrenovación, así como también la tasa de supervivencia es mejor en condiciones de cultivo en ausencia de

suero o ausencia de células nodrizas, en comparación a las células silvestres que entran directamente en apoptosis y detienen su propagación *in vitro*. En este estudio quedó demostrado también que Bcl-2 actúa en el bloqueo de la diferenciación [61], aunque otros estudios han sugerido su papel en procesos de diferenciación de CMEs [93, 94]. En el mismo sentido otro estudio demuestra que las CMEs utilizan a las caspasas para una rápida y efectiva desactivación de Nanog, interrumpiendo el circuito autorregulador que mantiene la pluripotencia en estas células. La caspasa 3 juega un papel dominante en esta regulación negativa actuando directamente sobre Nanog o interactuando como un cofactor con Caspasa 9 desactivándolo a través de corte peptídico sobre el N-terminal, desestabilizando de esta manera la formación del homodímero y provocando la subsiguiente degradación. Esta regulación de Nanog a través de su degradación mediada por Caspasas juega un papel crítico en la diferenciación de las CMEs [95].

Por lo tanto en nuestro modelo, si el efecto anti-apoptótico del NO pasa por la inactivación de las caspasas, el sistema de regulación de Nanog descrito, podría consecuentemente encontrarse desactivado, correspondiéndose con los altos niveles de Nanog en las células tratadas, influyendo sobre la autorrenovación de las CMEs. Además nuestros resultados también sugieren que el efecto protector del NO es a través de la regulación de la expresión de genes involucrados en apoptosis.

Nuestros resultados obtenidos con CMEs de ratón cultivadas en ausencia de LIF y tratadas con 2 μ M de DETA-NO fueron

reproducidos también en CMEs humanas. Células de la línea H181 fueron cultivadas a baja densidad sobre placas con matrigel y en ausencia de células nodrizas (*feeder layers*) y de bFGF; las células fueron tratadas desde el pase con 2 μ M de DETA-NO. Los resultados obtenidos son muy similares a aquellos de las CMEs de ratón en lo que respecta a la expresión de marcadores de superficie como SSEA-4 (Figura 14) y altos niveles de los marcadores de autorrenovación Oct4, Sox2 y Nanog en comparación a las células cultivadas solo en ausencia de bFGF. A pesar de que existen muchas semejanzas entre CMEs de ratón y CMEs humanas también existen notables diferencias con respecto a marcadores de superficie, vías de señalización que promueven la autorrenovación y sobre todo propiedades de crecimiento. Por ejemplo, las CMEs de ratón son positivas para el antígeno de superficie SSEA-1 pero no para SSEA-3 y 4. Por el contrario las CMEs de humanas son negativas para SSEA-1, pero presentan tinción positiva para SSEA-3 y 4. Esta diferencia en la expresión de estos marcadores también se percibe en nuestro modelo experimental (Figura 12 y 14b). En las CMEs embrionarias humanas la activación de SMAD 2/3 por TGF- β /Activina/Nodal (vía de señalización TGF- β) así como la señalización mediada por FGF parecen cumplir un papel central en el sostenimiento de la autorrenovación y han sido propuestas como sistemas de propagación bajo condiciones químicamente definidas con suplemento de FGF básico (*bFGF*) [56, 96].

Adicionalmente, a diferencia de las CMEs de ratón, las CMEs humanas despliegan muy baja eficiencia en el mantenimiento de sus características de autorrenovación, después de varios pases continuos

con altas tasas de diferenciación espontánea [97, 98]. A pesar de estas diferencias mostradas por ambos tipos celulares, nuestros resultados obtenidos con las células madre embrionarias humanas tratadas con 2 μ M de DETA NO, son similares a aquellas mostradas para las CMEs de ratón con respecto a la expresión de marcadores de autorrenovación y pluripotencia. Es importante resaltar que el cultivo con NO, se hace desde el mismo día del pase y tomando en cuenta las características de liberación estable y el tiempo de vida media del donador de aproximadamente 19 horas. Esto podría producir que la concentración de NO en el medio de cultivo sea el óptimo y se mantenga estable como para controlar la salida del estado de autorrenovación. Aun queda por dilucidar la existencia de un mecanismo común para los dos tipos celulares a través del NO, que sea independiente de las vías de señalización canónicas descritas para el mantenimiento de estas funciones en las CMEs.

El potencial de las CMEs como fuente de células y tejidos para trasplante en medicina regenerativa está en el mantenimiento de su pluripotencia, un método bastante utilizado para medir esta capacidad es la capacidad de formación de teratomas cuando son inyectadas en ratones inmunodeprimidos. Las CMEs no diferenciadas y pluripotentes deberán tener capacidad de formar teratomas y las células diferenciadas que han perdido su pluripotencia no. Los teratomas típicamente contienen una mezcla de tipos celulares parcialmente o totalmente diferenciados, una característica que indica que las CMEs son capaces de diferenciar en múltiples tipos celulares. Por esta razón es que las CMEs de ratón de la línea D3-Oct4-GFP y humano de la línea H181 tratadas con 2 μ M de DETA-NO en ausencia de LIF y bFGF

respectivamente, fueron inyectadas en ratones para observar la formación de teratomas. Interesantemente ambas líneas celulares dieron positivo para la formación de tejidos de las tres capas germinales, comprobando así que el tratamiento con NO ayuda a mantener la pluripotencia de las CMEs aun en ausencia de los factores de crecimiento como LIF o bFGF que mantienen sus propiedades *per se* *Figura 16 y 17*.

Es importante precisar que después de un protocolo de diferenciación, algunas células resultantes pueden mantener su capacidad de pluripotencia y por lo tanto de formación de teratomas. Por esa razón, muchas veces experimentos de terapia celular se han visto opacados por el riesgo de la formación de teratomas después del transplante de las CMEs. Por ejemplo las CMEs de ratón pueden ser diferenciadas a neuronas dopaminérgicas funcionales después del transplante intrastriatal en ratas modelo para enfermedad de Parkinson, pero la aparición de teratomas posterior al transplante fue de alrededor de un 20% de los receptores inmunodeprimidos [99].

El óxido nítrico modifica la expresión de genes que controlan la autorrenovación y pluripotencia de las CMEs. En la actualidad se conocen diversos mecanismos que controlan la transición de las CMEs desde el estado de autorrenovación/pluripotencia hacia la diferenciación. Todos ellos involucran la regulación de la expresión, actividad e interacción de los componentes de la intrincada y dinámica red de proteínas de pluripotencia y diferenciación con el objetivo de controlar a aquellas proteínas responsables de la diferenciación hacia

linajes determinados, por lo general las proteínas de pluripotencia son silenciadas para dar paso a la diferenciación.

Como ya se ha establecido, Oct4, Sox2 y Nanog son componentes centrales en la jerarquía reguladora transcripcional que especifica la identidad de las CMEs debido a sus patrones de expresión únicos, así como a sus papeles esenciales durante el desarrollo temprano. Es probable que los reguladores claves del estado de “célula madre” se unan y regulen a genes que codifican otros reguladores transcripcionales, los cuales a su vez determinan el potencial de desarrollo de estas células. Las evidencias sugieren que Oct4, Sox2 y Nanog contribuyen a la pluripotencia y autorrenovación por activación de sus propios genes y de otros genes que codifican para componentes de vías de señalización claves, así como por genes represores que son determinantes para procesos de desarrollo, formando de esta manera una intrincada red de interacciones en el circuito central de mantenimiento de la autorrenovación/pluripotencia [100].

Dentro de las características más sobresalientes de esta red es importante anotar que se encuentra enriquecida por proteínas que individualmente son requeridas para el control de la supervivencia y diferenciación de células de la masa celular interna, o en aspectos de desarrollo temprano. Muchos genes que codifican para proteínas de la red son co-regulados, y específicamente reprimidos durante la diferenciación de las CMEs. La co-regulación de genes en las redes es consistente con su participación en funciones o vías celulares comunes. La mayoría de los genes de la red han sido reportados como “dianas directas” de Nanog y Oct4, sirviendo así como efectores en la red de

pluripotencia. La red a su vez está ligada a algunas vías de cofactores, las cuales están involucradas mayormente como mediadores de represión transcripcional. Estos incluyen a los complejos histona deacetilasa-NuRD y remodelador de cromatina SWI/SNF. Es importante anotar que Rex1 y Oct4 o sus proteínas más cercanas, se encuentran asociadas con componentes del complejo Polycomb, mientras que Nanog está ligada a HDAC/NuRD a través de su asociación con Sall1/4 y Nac1 [12].

En nuestro estudio reportamos la modulación de la expresión de 15 reguladores transcripcionales implicados en el control del estado de autorrenovación/pluripotencia en la línea R1/E de CMEs de ratón tratadas con 2 μ M de DETA-NO. Algunos de estos genes han sido reportados previamente como componentes del circuito de regulación transcripcional de la pluripotencia por otros autores [8, 12, 100, 101]. Los valores de cambio de expresión relativa obtenidos para los 15 genes seleccionados en las células tratadas con NO con respecto a las células cultivadas en ausencia de LIF, se utilizaron para generar una red de interacción con la finalidad de observar su posible interacción bajo el efecto del tratamiento con óxido nítrico (Figura 20).

Como se muestra en la figura 20, los 15 genes estudiados se distribuyen en dos grupos dependiendo de su interacción con las moléculas centrales, para este caso Nanog/Oct4/Sox2 y cMyc. Como ya hemos visto Nanog/Oct4/Sox2 incrementan su expresión con el tratamiento, así como también Sall4, Zic3, FoxD3, NR0B1 (Dax1), estas proteínas interactúan entre ellas y son requeridas para el mantenimiento de células pluripotentes en el embrión temprano de

ratón, así como para el establecimiento de líneas CMEs murinas. Por ejemplo, FoxD3 tiene dos funciones entrelazadas: Esta proteína es requerida para mantener la supervivencia y la autorrenovación de las CMEs mientras que simultáneamente reprime la diferenciación hacia vías de diferenciación normales (endodermo y mesodermo) o aquellas anormales (trofotodermo) [102]. Sall4 es un regulador importante en el desarrollo temprano del embrión de ratón, actuando como un activador de la expresión de Oct4 y co-ocupando muchas regiones del genoma de las CMEs junto con Nanog, su rol estaría más dirigido a la estabilización de las CMEs y represión de la diferenciación hacia trofotodermo antes que al control de la pluripotencia [103, 104]. Mientras que Dax1 actúa regulando positivamente la expresión de Oct4 a través de la interacción con Lrh1 [105]; y Zic3 puede activar indirectamente a Nanog y mantener la pluripotencia previniendo la diferenciación hacia linaje endodermal en CMEs [106]. Por otro lado en esta red de interacción con Nanog/Oct4/Sox2 encontramos también genes que disminuyen su expresión después de su exposición a NO. La desregulación de Esrrb ha sido relacionada con eventos de diferenciación de las CMEs. Sobre el promotor de Oct4 se han encontrado dos sitios de unión para Esrrb, uno de ellos responsable de su regulación transcripcional. También se han reportado los sitios de unión de Esrrb sobre otros genes importantes como Nanog, Rex1 o Rest, así como otras dianas [107, 108]. Es posible que el tratamiento con NO tenga un efecto directo sobre la regulación de Esrrb y que este contribuya a los niveles de expresión mostrados por el resto de genes de la maquinaria y que su efecto sea dependiente de LIF.

El tratamiento con NO promueve que los genes básicos que controlan la autorrenovación sean expresados a niveles suficientemente altos como para prevenir la salida de las CMEs del estado de autorrenovación aun en condiciones impuestas por la ausencia de LIF [40]. Particularmente, una característica del patrón de expresión de la maquinaria de regulación transcripcional de las CMEs promovida por el tratamiento con NO es la regulación negativa del gen *Rex1/Zfp42*. Aunque *Rex1* es comúnmente usado para distinguir epiblasto y ectodermo primitivo (PrE) de la masa celular interna (MCI) [109], en CMEs *Rex1*^{-/-}, también se ha encontrado relacionado con el incremento de los niveles del marcador de meso-endodermo *Brachyury*, marcadores de endodermo *Gata 4* y *Gata 6* y de ectodermo *Fgf 5* y *Nestina* [110]. En este trabajo no hemos encontrado ninguna evidencia de diferenciación celular relacionada con la desregulación de *Rex1*, ya que todos los marcadores arriba mencionados, excepto *Nestina*, presentan niveles de expresión inducidos por el NO menores que los encontrados en las células cultivadas en ausencia de LIF (Figura 9, 11 y 15). Estos resultados son apoyados por la propuesta presentada por Masui y cols. en 2008 en la que demostraron que *Rex1* no es indispensable para el mantenimiento de la pluripotencia y autorrenovación [111].

Un hecho importante a tener en cuenta, es que en la red generada a partir de los valores de expresión de los genes del circuito de regulación transcripcional la segunda molécula central es *cMyc*, su expresión se encuentra reprimida en las células tratadas con NO, y que interactúa directamente con *nMyc* con el que forma un complejo regulador, además está relacionado funcionalmente con *Myb*, *Sin3A*,

Creb y Zfx e indirectamente con Thap11 (Ronin) y Creb1. El efecto supresor sobre la regulación transcripcional de cMyc por el NO se ha reportado previamente en células madre de carcinoma embrionario (ECs) [112]. cMyc es reconocido como un factor importante para la reprogramación hacia células iPS como regulador de la eficiencia transcripcional de genes de mantenimiento del estado de célula madre, así como su aporte sobre el ciclo celular y la proliferación de CMEs, funciones que como se demuestra en esta tesis se encuentran moduladas por el tratamiento y que por esta razón cMyc merecería una especial atención para el estudio mecanístico del efecto del NO.

La baja expresión de cMyc promovida por el tratamiento con NO podría estar teniendo un efecto drástico sobre la expresión de múltiples genes ya que en las CMEs cMyc ocupa genes involucrados en proliferación celular, a través de su papel en el proceso de *pausa-liberación* por parte de la ARN polimerasa II (RNA pol II) en alrededor de un tercio del total de los genes activamente transcritos. cMyc puede actuar reclutando otros factores sobre la región promotora proximal de estos genes, facilitando así la activación de la RNA pol II y mejorando la eficiencia de la transcripción para estos genes [113].

Estos resultados sobre la expresión de los componentes de la red transcripcional de las CMEs de ratón después del tratamiento con NO, sugieren que esta molécula estaría promoviendo cambios en su transcriptoma que podrían ayudar al mantenimiento de la autorrenovación y la pluripotencia así como al retraso en la entrada de la diferenciación. Un aspecto relevante del tratamiento con el NO en las CMEs es que promueve cambios en la estructura de la cromatina y la

expresión génica de genes involucrados en otras funciones básicas importantes como la proliferación celular y la muerte celular.

Los efectos transcripcionales del NO han sido reportados en diferentes tipos celulares y tejidos, principalmente sobre proteínas como NF κ B, p53 y factores de transcripción conteniendo motivos de unión al ADN tipo dedos de zinc [55]. Además también ha sido reportada su acción sobre cMyb [114] y Creb [54]. Así mismo el NO tiene un efecto sobre la regulación negativa de nMyc relacionada con la disminución de la proliferación y la diferenciación neuronal [32]. Durante el tratamiento encontramos que la expresión de nMyc no se ve alterada por el tratamiento con NO, sumado a la disminución de la expresión de cMyc, estos eventos podrían estar relacionados con la modulación de la proliferación y la regulación del ciclo celular de las CMEs que también se ven afectadas por el tratamiento (Figura 29).

De los estudios transcripcionales a nivel geonómico que hemos realizado podemos destacar:

Primero, que el tratamiento con NO exógeno no indujo una modulación severa sobre los valores de expresión relativa para la mayoría de los genes, esto debido probablemente a que la liberación de NO producida por la concentración usada del donador DETA-NO (2 μ M) contribuye a mantener una concentración del mismo, cercana al rango de concentración fisiológica (pM – nM) reportada para algunos tipos celulares [41, 115]. Menos de 12% de las sondas mostraron un incremento superior a 4 veces y solo 1 sonda disminuyó más de 4 veces (Figura 21). De esta manera considerando el alto porcentaje de sondas

con valores entre 1.2 y 3 de cambio de expresión relativa (73% para genes regulados positivamente y 87% para aquellos regulados negativamente), aplicamos como valor de corte 1.2 para las veces de cambio de la expresión relativa que además satisfaga el nivel de significancia estadística ($p < 0.05$). Las pruebas estadísticas modernas permiten que aquellos genes con cambios arbitrariamente pequeños sean considerados estadísticamente significativos. Se ha vuelto muy común y conveniente, que genes diferencialmente expresados satisfagan ambos criterios simultáneamente.

Segundo, las diferencias en los niveles de expresión de genes relacionados con el desarrollo y la diferenciación en células cultivadas en la ausencia de LIF y células expuestas a bajo NO podrían explicarse por la modulación de la red del circuito básico transcripcional promovida por el NO descrita en nuestros resultados. La regulación positiva de muchos de sus componentes podría mantener la ocupación de complejos represores sobre genes de diferenciación temprana, contribuyendo al mantenimiento de la autorrenovación. Mientras que en las células cultivadas en ausencia de LIF después de cinco días, esta maquinaria transcripcional se encuentra reprimida, permitiendo así la expresión de genes de diferenciación.

Las categorías funcionales más destacadas, representadas en la Figura 22 y enumeradas en la lista de los genes modificados por NO encontramos: a) Muerte celular donde encontramos genes anti-apoptóticos y pro-apoptóticos y es la categoría con la máxima cantidad de genes diferencialmente expresados en CMEs de ratón y en CMEs humanas, 124 y 84 genes respectivamente. Estos resultados confirman

el efecto anti-apoptótico del tratamiento con bajas dosis de NO exógeno, ampliamente discutido y soportado por efectos similares reportados previamente para el NO en otros tipos celulares. b) Una de las categorías más importantes relacionadas con las CMEs, es aquella que agrupa a los genes involucrados en desarrollo y diferenciación. El análisis detallado de esta categoría nos muestra el efecto del NO sobre los genes que controlan el proceso de diferenciación y observamos que la expresión de 5 de los 11 factores de transcripción que incrementan su expresión poseen función en la autorrenovación. Por ejemplo, Pbx1 posee sitios consenso sobre el promotor de Nanog donde se encuentra unido activando su expresión durante el estado indiferenciado. La desregulación de Pbx1 se ha encontrado asociada con la diferenciación [116]. Pou2f2 es una proteína con dominio POU al igual que Pou5f1 (Oct4) y su expresión ha sido relacionada con la expresión de iNOS durante la diferenciación de las células B [117, 118].

Otros genes importantes regulados positivamente son las proteínas de unión a ligando como Wnt4, Lamb1, también importantes para el mantenimiento de la autorrenovación. Por otro lado, entre los genes de factores de transcripción que están regulados negativamente, encontramos a Neurod1 un gen de diferenciación neurogénica, que también ha sido implicado en vías de señalización en el islote pancreático [119, 120], y luego genes de regulación de la familia Stat como (Stat5b y Stat2) que controlan la transición desde el estado primario (*naïve*) hasta el estado activado (*primed*) de las CMEs. Si bien encontramos una disminución de la expresión génica de β -catenina y Tcf3, no existe evidencia que sugiera una transición hacia el estado activado durante el tratamiento. El impacto de la disminución de la

expresión del gen de β -catenina en las CMEs permanece controversial. Se ha reportado que las CMEs mutantes que no expresan β -catenina continúan en autorrenovación y conservan la impronta transcriptómica de las células en estado primario pluripotente, mientras que reportes previos sugirieron que la pérdida de β -catenina podría promover la transición hacia *células madre epiblasticas (EpiSCs)* [121]. Sin embargo es necesario estudiar en detalle cual es el efecto del NO sobre la transición hacia EpiSCs o hacia cualquier otro tipo celular.

Podemos afirmar a partir de los resultados obtenidos del análisis funcional de los genes involucrados en desarrollo y diferenciación que no hemos encontrado un perfil de expresión consistente con células comprometidas a diferenciarse hacia un tipo celular específico. Marcadores canónicos para las tres líneas germinales que aparecen durante la primera semana del proceso de diferenciación de las CMEs en ausencia de LIF y bFGF no muestran una expresión diferencial bajo el tratamiento con NO (Figura 9, 11 y 15). Corroborando a nivel geonómico la capacidad del NO de prevenir la salida del estado de autorrenovación/pluripotencia y retrasando la entrada en diferenciación en las CMEs. Mostrando para algunos genes, un patrón de expresión exclusivo por el tratamiento y para otros un patrón similar con genes comunes al mostrado por las células no diferenciadas cultivadas en presencia de LIF (Figura 23).

El ciclo celular es el encargado de soportar la replicación y la transferencia de la información del genoma a las células de la progenie, tanto en las células embrionarias como en las somáticas. En las células somáticas, ciertos puntos de restricción estratégicamente ubicados

proporcionan seguridad para la integridad genómica, así como para el avance durante la progresión del ciclo celular. El ciclo celular de las CMEs es característicamente corto, esto debido principalmente a la brevedad de la fase G1. Las células somáticas deben orquestrar la activación secuencial de genes específicos del ciclo celular, mientras que las CMEs humanas y de otras especies, poseen un transcriptoma en estado primario que soporta la proliferación y no están “sobrecargadas” con la intrincada red transcripcional requerida para la especialización y expresión de genes fenotípicos [100, 122, 123].

La inducción de la diferenciación en las CMEs es un evento ligado entre la prolongación de la fase G1/S y una inhibición de la expresión de genes requeridos para la entrada en la fase S. Los reguladores claves del estado pluripotente Oct4 Sox2 y Nanog cumplen también un papel importante en el ciclo celular. Por ejemplo la sobreexpresión de Nanog incrementa significativamente la proliferación de las CMEs humanas a la vez que enriquece su fenotipo pluripotente, esto debido a que mejora la transición de G1 a S, reduciendo el tiempo necesario para la entrada en fase S y causando un incremento en el número de células en esta fase. La unión directa del dominio C-terminal de Nanog a regiones reguladoras de los genes de Cdk6 y Cdc25A está relacionada con este punto de control [124, 125]. Mientras que Oct4 también se ha encontrado involucrado en la regulación de la transcripción de Cdc25A y Cdk4 y su inhibición puede regular negativamente genes de proliferación y un incremento en el inhibidor del ciclo celular p21 [124]. Es evidente que otros marcadores de pluripotencia pueden estar también involucrados en el control del

ciclo celular y que este control es importante para la transición hacia la diferenciación.

Al analizar los datos obtenidos en nuestros experimentos, encontramos que una de las categorías funcionales modulada por el tratamiento con NO es el ciclo celular, representada por 52 moléculas en CMEs de ratón y 10 moléculas en humano (Tabla 2 y 5; Figuras 24 y 29). Estos 52 genes en CMEs de ratón incluyen aquellos del punto de control de la transición G1/S como Cdk2 el cual se encuentra reprimido y Cdk6 que se induce notablemente, esto sugiere que el NO podría estar modulando la dinámica de el equilibrio entre Ciclina D-Cdk 4/6 y Ciclina E-Cdk2. Por otro lado, y en mayor número encontramos genes que regulan el punto de control en G2/M, como Cdc25b, Pttg1 y Aurora quinasa B que son blancos del complejo LINC del cual encontramos a Lin52 regulado negativamente. La regulación positiva sobre cMyb puede aumentar la presencia de complejos E2f-cMyb los cuales controlan la regulación transcripcional de genes G2/M.

El NO tiene un potente efecto anti-tumoral y anti-aterosclerótico. Estos efectos están cercanamente asociados con su capacidad para bloquear la proliferación celular y su acción ha sido atribuida a mecanismos independientes de cGMP. Se ha reportado que el NO ejerce un amplio control a nivel transcripcional del ciclo celular a través de la activación de componentes de la vía p38-MAPK y un bloqueo del ciclo en G2/M en la línea celular de leucemia U937 [126]. Un requerimiento clave para la autorrenovación de las células madre es la represión de los supresores de tumor p16 (Ink4a) y p19 (Arf). Esta represión se va perdiendo conforme la célula va envejeciendo [127]. Es

evidente que las condiciones de cultivo en ausencia de LIF podrían tener un efecto sobre la reducción de la fase S, además la heterogeneidad de la población celular, sugiere que muchas células pueden haber entrado en diferenciación. El alto porcentaje de células bloqueadas en la fase G2/M, durante el tratamiento con NO promovida por la modulación de la expresión de genes que controlan los puntos de control en esta fase; junto con la regulación de la expresión de los genes de pluripotencia y diferenciación discutidas anteriormente, apoyan la propuesta del retraso en la entrada al proceso de diferenciación promovido por el tratamiento. Estos eventos están estrechamente relacionados con el efecto anti-apoptótico del NO, activando componentes de la maquinaria de reparación del ADN, como Gadd45a, Rad51l3, Dnase2a, Ddb2, Polh, sugiriendo que el NO podría contribuir al retraso en la diferenciación a través de una disminución en la tasa de proliferación y deteniendo a las células en fase G2/M (Figura 29) para atender a la reparación del ADN y asegurar la estabilidad del genoma. Estudios especializados sobre el ciclo celular de las CMEs bajo el efecto del NO son necesarios para esclarecer el papel de esta molécula en estos procesos.

En los últimos años, los estudios de regulación de la expresión génica, se han visto notablemente enriquecidos por los avances en el conocimiento del control epigenético y sus implicancias en la remodelación de la estructura de la cromatina. Una vez más los estudios a nivel geonómico han ayudado a despejar el panorama de lo que sucede en las células a nivel nuclear, a través de la interacción de los factores de transcripción y los cambios permisivos o restrictivos propiciados por las modificaciones en las histonas. Las propiedades

epigenéticas pueden ser categorizadas bajo tres títulos característicos, muchas veces llamados “pilares de la epigenética”: metilación del ADN, modificaciones de histonas y las actividades de los pequeños ARNs de interferencia. Las CMEs llevan marcas de cromatina que normalmente están asociadas con la transcripción activa, incluyendo altos niveles de H3 y H4 acetilada y de H3K4 tri-metilada. Pero a su vez algunos de estos genes se encuentran también enriquecidos para la histona represiva H3K27 tri-metilada, es decir ambas marcas de cromatina están cercanamente yuxtapuestas y ocurren en promotores altamente conservados y relacionados con eventos de desarrollo temprano [21, 22, 128].

Los resultados mostrados, conforman la primera evidencia de cómo el tratamiento con bajas concentraciones de NO exógeno modifica la expresión de genes relacionados con la estructura de la cromatina en las CMEs de ratón y que en consecuencia afecta a otras funciones previamente descritas. Específicamente, se encontraron 39 genes involucrados en procesos epigenéticos como: metilación del ADN, factores de transcripción, componentes de complejos de remodelación de la cromatina y por ultimo histonas y sus modificadores (Figura 30a). Además mostramos que el tratamiento provoca cambios en los patrones de modificación de las histonas, incrementando la tri-metilación de lisinas 4, 9 y 27 de la histona 3, así como la acetilación de histona H4. Sin embargo la acetilación de H3 no muestra cambios significativos (Figura 30b). Estos cambios en los niveles de expresión de las marcas epigenéticas podrían estar relacionadas con la regulación transcripcional de proteínas y enzimas que intervienen en la modificación de histonas mostradas en la figura

30A. A su vez estas histonas modificadas pueden ocupar regiones promotoras sobre genes de mantenimiento de pluripotencia o de diferenciación y regular la expresión génica de manera exclusiva como en el caso de Brachyury, y probablemente cambiando el equilibrio de las marcas bivalentes en genes de diferenciación (Figura 31). La regulación por NO de todos estos componentes y del patrón de expresión de los genes del circuito de mantenimiento de la pluripotencia determinan un patrón único de expresión de las CMEs cultivadas en ausencia de LIF.

Recientes estudios han demostrado que la señalización por NO juega un papel importante en la expresión de múltiples genes por activación de elementos *cis* sobre los promotores [129]. La modificación de histonas deacetilasas (HDAC2) a través de la nitrosilación de residuos de cisteína ha sido demostrado en diferenciación de células neuronales y en el tratamiento de distrofia muscular de Duchenne, como un mecanismo de regulación transcripcional [55, 130].

Es importante resaltar que todos los experimentos revisados en la literatura para la presente tesis reportan tratamientos con altas concentraciones de donadores. Por lo que confrontar con precisión nuestros resultados no es posible ya que nuestro trabajo es el primero que se hace usando bajas concentraciones. Aunque no está claramente demostrado, el NO podría ejercer su función sobre componentes de la cromatina modificando directamente la configuración de las marcas de las histonas y en algunos casos los estados de metilación del ADN, y su

ocupación por factores de transcripción específicos, tanto a altas como a bajas concentraciones.

Uno de los resultados más notables que pudimos observar a partir del análisis del transcriptoma a través de la búsqueda de interacción de los genes que se encontraron diferencialmente expresados es el relacionado con un posible efecto similar a hipoxia. El tratamiento con NO modifico la expresión de un número de genes implicados en respuesta a hipoxia (Tabla 9). Algunos de ellos interactúan alrededor del gen Von hippel-lindau (Vhl) en una de las sub-redes descubiertas a partir de una red de interacción mayor compuesta por alrededor de 84 moléculas. El hallazgo de esta interacción de Vhl con otros genes de respuesta a hipoxia sugiere una posible activación de la señalización a través de la regulación del factor inhibidor de hipoxia (Hif por sus siglas en inglés). Se han propuesto mecanismos por el cual altas concentraciones de NO promueve la estabilización y activación transcripcional de Hif1 α . El NO promueve la estabilización de Hif1 α a través de la inhibición de prolil-hidroxilasas (PHD) o a través del bloqueo de la interacción entre Vhl y Hif1 α -prolil-hidroxilado [112, 131].



Figura 33. Modelo propuesto para los efectos de las bajas concentraciones de óxido nítrico sobre el transcriptoma de las CMEs

Finalmente, los resultados obtenidos en la presente tesis, pueden ser resumidos en el esquema desplegado en la figura 33, donde tenemos que: i) Las bajas concentraciones de NO retrasa la diferenciación celular y previene la salida del estado de autorrenovación. ii) La inhibición del proceso de muerte celular a través de la modulación de muerte celular dependiente de la mitocondria. iii) La regulación de la proliferación celular a través del bloqueo del ciclo celular en la fase G2/M iv) La regulación de cambios en la estructura de la cromatina que inducen una expresión génica diferencial en las CMEs. v) La activación de una respuesta similar a hipoxia a través de la regulación negativa del gen Vhl y la modulación de la expresión de otros genes diana de Hif. Todos estos eventos cercanamente conectados podrían jugar un papel destacado en el estado de pluripotencialidad/autorrenovación de las CMEs. Por lo tanto nuestra propuesta final se sostiene en las acciones de las bajas concentraciones de NO sobre la regulación de genes responsables de modificaciones epigenéticas las cuales promueven alteraciones en la estructura de la cromatina que contribuyen a la

preservación del estado no diferenciado en las células madre embrionarias.

Conclusiones

VI. Conclusiones

De los resultados obtenidos del presente trabajo de tesis, podemos concluir:

1. La expresión de las diversas isoformas de la óxido nítrico sintasa presenta una dinámica que está relacionada con los procesos de autorrenovación y diferenciación. La disminución de la expresión de eNOS está relacionada con la pérdida de pluripotencialidad y el incremento de la expresión de iNOS con la ganancia de diferenciación,
2. Bajas concentraciones de óxido nítrico suministrado exógenamente tienen un efecto positivo sobre la autorrenovación de las CMEs de ratón y humanas, siendo la concentración óptima de 2 μ M para el donador DETA-NO que correlaciona con una baja tasa de muerte celular y altos niveles de expresión de marcadores de pluripotencia. Las células que sobreexpresan eNOS muestran un mismo patrón de expresión que el tratamiento con bajas concentraciones de DETA-NO. A concentraciones mayores de 50 μ M se obtienen resultados opuestos.
3. El tratamiento con 2 μ M de DETA-NO sobre las CMEs cultivadas en ausencia de LIF ofrece un patrón de expresión génica del circuito básico de regulación de la pluripotencia incrementando la expresión de marcadores clásicos (Oct4, Nanog y Sox2) y disminuyendo la expresión de cMyc y Rex1.

4. A nivel transcriptómico el tratamiento con 2 μ M de DETA-NO promueve un perfil de expresión para un grupo de genes, similar al de las células no diferenciadas (cultivadas en presencia de LIF o bFGF), mientras que para otro grupo confiere un patrón de expresión exclusivo debido al tratamiento. Entre los genes comunes encontramos algunos genes que intervienen en el proceso de autorrenovación en vías no clásicas. Es importante concluir que el tratamiento con NO por si solo no es suficiente para el mantenimiento del estado de pluripotencia de las células madre embrionarias.
5. Durante el análisis del transcriptoma de las células tratadas con NO, no ha sido posible encontrar evidencias de diferenciación clara hacia ningún tipo celular específico. Por el contrario todos nuestros datos indican que hay una regulación génica dirigida hacia inhibir la entrada al proceso de diferenciación.
6. Bajas concentraciones de óxido nítrico regulan positivamente la expresión de genes anti-apoptóticos y negativamente los pro-apoptóticos.
7. El óxido nítrico controla el ciclo celular de las CMEs de ratón, provocando un bloqueo en la fase G2/M.
8. El tratamiento con óxido nítrico produce cambios significativos sobre la transcripción de genes involucrados en la remodelación de la estructura de la cromatina. Genes que participan en otros eventos epigenéticos como la metilación del ADN, están

también regulados por el tratamiento. Así mismo el óxido nítrico produce cambios en la ocupación de histonas modificadas sobre promotores de genes de pluripotencia y diferenciación.

9. El análisis de las redes de interacción génica muestran que el tratamiento con óxido nítrico provoca la represión de la expresión de Vhl y regula la expresión de algo más de 30 genes que participan en eventos de respuesta a hipoxia, sugiriendo que el tratamiento puede inducir una respuesta similar a hipoxia.
10. El cultivo bajo estas condiciones de NO puede contribuir al mantenimiento del estado no diferenciado de las CMEs reemplazando, no en su totalidad, a factores como el LIF o el bFGF.

===== *Anexos*

Tabla 2: Categorías de funciones fisiológicas y moleculares de genes regulados por DETA-NO en las CMEs
D3-pOct4-eGFP

Categoría	p-value	Moléculas	Número de genes
Muerte celular	9,16E-04-4,96E-02	ST6GAL1, CCR5, LIMS1, PGAP2, GLO1, ELAVL1, ARNT, MXD3, SOD2, RARA, FABP1, DNAJA3, HPK2, MAP3K2, GNE, STAT6, SON, CFL1, L1CAM, TCF3, IFNAR2, VOPPI, RUNX1T1, PRKACA, CYCS (includes EG-54205), CYR61, BRE, UBE2C, MAP2K6, GADD45B, AATF, DDIT3, POU2F2, PPF2R2A, SOCS2, SLC1A3, ELF4, CLEC11A, CREB1, FKBP8, MAP1LC3B, NSMCE1, PLA2G16, NEUROD1, UCP2, RHOC, GNAQ, ANXA4, BAK1, ZNF148, ENO1, TCF7L2 (includes EG-6934), CASP7, POLH, ABCD2, TAF4B, VPS28, KIF1B, ATP2B1, AHSP, PTTG1, AP2A2, CASP9, TNFSF9, HOXC6, WNT4, PRLR, GPX4, GSK3B, RET, HUWE1, PTPN6, DNASE2, FES, YWHAE, CDK6, BIRC6, MTA2, RORC, SDHC, ADI1, GSR, C14ORF153, PPF2R1A, ITGAM, LAT, VDAC1, CDK2, VHL, TACC1, MAP2K5, TK1, PEBP1, NOS1, EXT1, RNASEL, BCL2, TCF12, DEF6, BRAF, HMOX1, ALDH2, FANCD2, SDC2, CYB5B3, MLLT3, STAT5B, CUL9, CEBL1, PLSCR1, MAP2K7, CDC25C, RTRN, PRDM5, BAX, PSME3, PARP1, CAPNS1, CAT, G6PC, SMARCC1, ELK1, BCL2L11, PRKAR1A	124
Morfología celular	1,08E-03-4,96E-02	AHSP, FAT1, PTTG1, SNTA1, PBX1, LIMS1, AURKB, AP2A2, PGAP2, MYCBP2, CASP9, SOD2, MXD3, GPD2, DNAJA3, GSK3B, GNA13, GPX4, RET, MXI1, DNMT1, RASGRP2, PTPN6, ADD2, GAL3ST1, FES, CFL1, LAMA2, CDK6, L1CAM, CLASP2, TCF3, SIPA1L1, AKAP13, DTNA, VDAC1, MAP2, TACC1, MAP2K5, CDK2, MAP2K6, PEBP1, EIF4EBP2, PTGER3, MARK2, TAOK1, SEPT9, BCL2, CDC25B, BRAF, HMOX1, MAP4, SOS1, MLLT3, LPP, MAP2K7, CAPZB, UCP2, GNAQ, BAX, HMGA2, BAK1, COPG, PARP1, MARCKSL1, EPB41, TRIO, BCL11A, CAT, TSPO, SPR, MXD4, C6ORF108, BCL2L11, CASP7, PRKAR1A	76
Supervivencia de organismos	4,12E-02-4,29E-02	CCR5, PFN1, ATP2B1, PTTG1, PBX1, LIMS1, ARNT, SOD2, CASP9, DNAJA3, GSK3B, GPX4, GNA13, RET, HPK2, MXI1, STAT6, GGT5, C3, FES, LRP2, ANGPTL6, CNP, BIRC6, CDK6, IL12RB2, UBA6, MAPK8IP3, TCF3, MAFF, SP4, CCS, ITGAM, STAT2, CYR61, C1GALT1, GNAI, VHL, MAP2K5, AGTR1, ENAH, FLNB, SPRED1, SLC1A3, NRP1, SLC12A5, BCL2, TCF12, BRAF, DNMT3B, KRIT1, HMOX1, FANCD2, BMPR1A, CREB1, STAT5B, MAP2K7, CAPZB, GNAQ, ACCLY, PARP1, MARCKSL1, CBS, BCL2L11	64
Bioquímica de moléculas pequeñas	4,69E-05-4,96E-02	SRD5A2, ABCD2, DDB2, HEBP1, ADIPOR1, GLO1, SOD2, GPD2, FABP1, GPX4, GSK3B, BDH2, GGT5, ACACB, C3, ACSN1, GSTT3, SLC38A2, PSTK, DCI, GSR, STC1, GAD1, PRKACA, CYCS (includes EG-54205), VDAC1, TEXAS1, MAP2, TK1, NOS1, EIF4EBP2, DDIT3, MARK2, SLC1A3, NRP1, SLC38A1, SLC6A7, GCDH, BCL2, HMOX1, GSTT1, CLEC11A, PHYH, ACSS2, FABP4, STAT5B, ACO1, TRNAU1AP, ECHS1, UCP2, BAX, ACCLY, PEX5, ENO1, CAT, TSPO, G6PC, HAGH, ACSL1, POLH	60
Ciclo celular	2,22E-03-4,96E-02	PBRM1, KIF23, MAP2K6, DDIT3, AATF, PPF2R2A, POLA1, PTTG1, CNTR0B, IKZF3, AURKB, SEPT9, ELAVL1, BCL2, CDC25B, HMOX1, MXD3, SOD2, RARA, BPTF, HPK2, E4F1, MXI1, NEUROD1, STAT6, CDC25C, YWHAE, MTA2, PRDM5, CDK6, BAX, TCF3, PARP1, CCNG2, RUNX1T1, MXD4, SMARCC1, CYR61, AKAP9, CDK2, VHL	52
Organización y ensamble celular	2,22E-03-4,96E-02	PBRM1, KIF23, MAP6, PTTG1, MARK2, MID1, NRP1, IKZF3, AURKB, CDE2, BCL2, MAP4, RARA, DNAJA3, GSK3B, GNA13, BPTF, KIF2C, STAT6, CFL1, CNP, MTA2, L1CAM, CLASP2, BAX, RAD51L3, BAK1, SIPA1L1, MARCKSL1, EPB41, PEX5, SMARCC1, CYR61, MAP2, CXADR, MAP2K5, VHL, PRKAR1A	38
Desarrollo y función del sistema nervioso	2,22E-03-4,96E-02	ENAH, MAP6, KIF1B, SLC1A3, DAB1, BCL2, BRAF, MYCBP2, MXD3, RARA, CREB1, GSK3B, GNA13, RET, VSX2, MXI1, NEUROD1, PTPN6, GNAQ, L1CAM, BAX, VLDLR, PSME3, GSR, CBS, NR1D1, CAT, PRKACA, SPR, MAP2, ELK1, BCL2L11	32
Metabolismo de lípidos	4,69E-05-3,86E-02	SRD5A2, NOS1, ABCD2, EIF4EBP2, NRP1, ADIPOR1, GCDH, BCL2, PHYH, ACSS2, FABP1, FABP4, GPX4, STAT5B, BDH2, ECHS1, UCP2, C3, ACACB, GGT5, ACSS1, ACCLY, DCI, PEX5, CAT, TSPO, CYCS (includes EG-54205), G6PC, TEXAS1, ACSL1	30
Morfología de tejidos	9,92E-03-4,96E-02	NOS1, TAF4B, SLC1A3, PBX1, TAF7L (includes EG-74469), TCF12, BCL2, CLEC11A, KLHL10, FANCD2, RARA, FIGLA, FKBP8, VSX2, NEUROD1, STAT6, PTPN6, FES, NDRG1, LAMA2, FTO, BAX, TCF3, BAK1, ZNF148, FBXO2, DAZ2, BCL2L11	28
Desarrollo de órganos	3,91E-03-3,45E-02	NEUROD1, SRD5A2, ENAH, LRP2, AQP11, PBX1, L1CAM, BCL11B, BAX, DAB1, BAK1, BCL2, CTNBP1, RARA, DNAJA3, INVS, ROBO2, MAP2, RET, C1GALT1, CHD7, BCL2L11, AGTR1, PRKAR1A	24
Transporte molecular	6,69E-03-4,96E-02	NOS1, UCP2, ACACB, DDIT3, MARK2, SLC1A3, SLC38A1, SLC6A7, HEBP1, BAX, ACCLY, SLC38A2, BAK1, BCL2, HMOX1, CLEC11A, SOD2, ENO1, GPD2, CAT, FABP1, CYCS (includes EG-54205), VDAC1, CASP7	24
Compromiso celular	3,53E-03-4,36E-02	ABCD2, NOS1, FLNB, STAT6, C3, FAT1, SLC1A3, STRA13, BAX, APL1, BAK1, ARNT, BCL2, PARP1, HMOX1, CASP9, KLHL10, SOD2, CREB1, FBXO2, CAT, DTNA, SMARCC1, VHL	24
Desarrollo y función del sistema hematológico	1,12E-02-4,96E-02	TAF4B, STAT6, PTPN6, ADD2, FES, AHSP, PBX1, RORC, BAX, TCF3, BAK1, DEF6, BCL2, TCF12, EPB41, CLEC11A, CASP9, TNFSF9, RARA, WNT4, GSK3B, STAT5B, BCL2L11	23
Replicación, recombinación y reparación del ADN	3,91E-03-3,89E-02	KIF23, PBRM1, STAT6, PTTG1, CDK6, MTA2, CNTR0B, DDB2, IKZF3, BAX, RAD51L3, AURKB, PARP1, BCL2, RARA, CAT, SMARCC1, BPTF, AKAP9, CDK2, TK1, DNMT1, POLH	23
Desarrollo de tejidos	3,91E-03-4,61E-02	ENAH, PFN1, CFL1, FTO, RORC, L1CAM, DAB1, VLDLR, DEF6, BCL2, KRIT1, MARCKSL1, CASP9, BMPR1A, RARA, HECTD1, WNT4, ROBO2, HPK2, RET, MAP2, BCL2L11	22
Desarrollo embrionario	1,12E-02-4,96E-02	ENAH, PFN1, CFL1, PTTG1, FTO, DAB1, VLDLR, BCL2, CDC25B, MARCKSL1, MXD3, RARA, HECTD1, PRKACA, FKBP8, ROBO2, MAP2, HPK2, RET, MXI1	20
Metabolismo de ácidos nucleicos	1,49E-03-4,96E-02	ACACB, UCP2, MARK2, ACSS1, DDB2, ACCLY, GCDH, BCL2, SOD2, ENO1, GPD2, CAT, ACSS2, FABP1, CYCS (includes EG-54205), VDAC1, TK1, POLH	18
Síntesis de proteínas	8,71E-04-3,67E-02	TRNAU1AP, EIF4EBP2, EIF4G3, EIF4A2, BAX, FBXO6, ADAMTS9, PSTK, BAK1, BCL2, SOD2, EIF3D, EDEM3, FBXO2, EIF5A, GPX4, CASP7, EIF4B	18
Crecimiento y proliferación celular	1,51E-02-4,36E-02	NEUROD1, MAP2K6, USP21 (includes EG-27005), MTA2, BAX, BCL2, NUB1, SOD2, MXD3, NR1D1, CREB1, PRKACA, DNAJA3, CDK2, MXI1	15
Expresión génica	1,12E-02-4,96E-02	ZNF148, CTNNBP1, ELF4, RUNX1T1, CREB1, PRKACA, EIF4A2, GSK3B, TCF7L2 (includes EG-6934), EIF4B	10

Tabla 3: Funciones moleculares y de desarrollo celular de genes comunes inducidos (+LIF vs -LIF+DETA-NO)

Categoría	p-value	Moléculas	Número de genes
Organización y ensamble celular		AKAP13, SMG6, NAV1, AMIGO1, EXT1, L1CAM, CNPY2, VPS54, CXADR	9
Morfología celular	2,02E-03-4,34E-02	AKAP13, EXT1, L1CAM, CNPY2, LPP, CXADR, STYX	7
Desarrollo celular	9,68E-04-3,49E-02	AKAP13, SPRED1, HOXC6, EXT1, L1CAM, LPP, CXADR	7
Desarrollo y función del sistema nervioso	2,02E-03-4,73E-02	B4GALT6, NAV1, AMIGO1, EXT1, L1CAM, CNPY2, VPS54	7
Crecimiento y proliferación celular	1,2E-02-4,73E-02	SPRED1, B4GALT6, HOXC6, L1CAM, CXADR, STYX	6
Movimiento celular	2,02E-03-4,73E-02	NAV1, CKLF, EXT1, L1CAM, LPP	5
Bioquímica de moléculas pequeñas	1,8E-02-4,92E-02	EIF2S2, B4GALT6, EXT1, LPP	4
Desarrollo y función del sistema muscular y esquelético	2,91E-02-4,54E-02	RSAD2, GDF10, EXT1, CXADR	4
Desarrollo y función de tejido conectivo	9,68E-04-4,92E-02	L1CAM, LPP, TACC1	3
Desarrollo y función del sistema cardiovascular	4,03E-03-4,54E-02	SPRED1, L1CAM, CXADR	3
Transporte molecular	8,71E-03-4,73E-02	EIF2S2, AKAP13, SMG6	3
Señalización e interacción Célula-a-Célula	2,02E-03-3,18E-02	L1CAM, CXADR	2
Estructura y desarrollo del tejido linfóide	2,02E-03-2,59E-02	SPRED1, L1CAM	2
Desarrollo de tejidos	2,02E-03-3,18E-02	EXT1, L1CAM	2
Desarrollo embrionario	4,03E-03-3,76E-02	EXT1, L1CAM	2
Desarrollo de organismos	4,03E-03-1E-02	SPRED1, L1CAM	2
Morfología de tejidos	4,03E-03-1,8E-02	SPRED1, L1CAM	2
Muerte celular	1,6E-02-3,57E-02	EXT1, L1CAM	2
Mantenimiento y función celular	1,6E-02-4,34E-02	AKAP13, VPS54	2
Metabolismo de carbohidratos	1,8E-02-4,54E-02	EXT1, LPP	2
Metabolismo de lípidos	1,8E-02-4,92E-02	B4GALT6, LPP	2
Modificación post-traducciona	3,18E-02-4,54E-02	AKAP13, MLL3	2
Hematopoesis	2,02E-03-2,02E-03	L1CAM	1
Desarrollo de órganos	4,03E-03-1,2E-02	L1CAM	1
Morfología de órganos	4,03E-03-1E-02	L1CAM	1
Desarrollo y función de cabello y piel	1E-02-1E-02	L1CAM	1
Desarrollo y función del sistema renal y urológico	1E-02-1E-02	L1CAM	1
Desarrollo y función del sistema reproductivo	1,2E-02-2,59E-02	STYX	1
Degradación de proteínas	1,6E-02-1,6E-02	ADAMTS9	1
Síntesis de proteínas	1,6E-02-1,6E-02	ADAMTS9	1
Metabolismo de ácidos nucleicos	2,2E-02-2,2E-02	EIF2S2	1
Señalización celular	3,37E-02-3,37E-02	SPRED1	1
Expresión génica	3,37E-02-3,37E-02	AKAP13	1
Reparación y daño del ARN	4,34E-02-4,34E-02	SMG6	1
Tráfico de ARN	4,73E-02-4,73E-02	SMG6	1

**Tabla 4: Funciones moleculares y de desarrollo celular de genes comunes reprimidos
(+LIF vs -LIF+DETA-NO)**

Categoría	p-value	Moléculas	Número de genes
Bioquímica de moléculas pequeñas	2,46E-03-4,56E-02	ABCD2, SNTA1, MPST, MTL5, ACLY, MDH1, PSTK, STC1, ITGAM, FARS2, CAT, SYPL2, PRKAG2, SPR, CPNE7, ACSL1, MCCC2	17
Morfología celular	3,83E-03-4,5E-02	STC1, DOCK1, TRIO, ITGAM, DNER, CAT, SNTA1, SYPL2, SPR, KIF2C, ANKRD27	11
Organización y ensamble celular	3,83E-03-4,87E-02	STC1, DOCK1, TRIO, ITGAM, DNER, CAT, KIF2C, ODF2, EIF4B, ANKRD27	10
Desarrollo y función del sistema nervioso	3,83E-03-4,87E-02	CTNNEB1, DOCK1, TRIO, ITGAM, YWHAE, NR1D1, DNER, CAT, SNTA1, SPR	10
Transporte molecular	3,83E-03-4,56E-02	ABCD2, STC1, DISP1, YWHAE, SNTA1, CAT, PRKAG2, ACLY, ACSL1	9
Metabolismo de lípidos	2,46E-03-4,5E-02	ABCD2, SNTA1, CAT, PRKAG2, CPNE7, ACLY, ACSL1	7
Muerte celular	7,64E-03-4,56E-02	ABCD2, STC1, ITGAM, YWHAE, CAT, MDH1, CUL9	7
Desarrollo de tejidos	5,5E-04-4,47E-02	CTNNEB1, STC1, TRIO, ITGAM, CAT, SYPL2	6
Desarrollo y función del sistema muscular y esquelético	2,62E-03-4,87E-02	CTNNEB1, STC1, TRIO, SF3B2, SNTA1, SYPL2	6
Desarrollo de órganos	3,83E-03-4,13E-02	CTNNEB1, STC1, TRIO, YWHAE, CAT, FIGLA	6
Metabolismo de carbohidratos	3,83E-03-4,56E-02	CAT, PRKAG2, GBE1, ACLY, AGL	5
Señalización celular	3,83E-03-3,39E-02	STC1, DISP1, TRIO, YWHAE, SYPL2	5
Compromiso celular	3,83E-03-4,5E-02	ABCD2, FIGLA, CAT, KIF2C, ACSL1	5
Movimiento celular	3,83E-03-4,87E-02	STC1, DOCK1, ITGAM, NR1D1, CAT	5
Desarrollo celular	1,14E-02-4,84E-02	STC1, ITGAM, NR1D1, DNER, SPR	5
Desarrollo y función del sistema cardiovascular	3,83E-03-2,65E-02	STC1, CTNNEB1, ITGAM, CAT	4
Morfología de tejidos	3,83E-03-4,87E-02	STC1, YWHAE, CAT, ACSL1	4
Metabolismo de vitaminas y minerales	3,83E-03-3,39E-02	STC1, YWHAE, SYPL2, ACLY	4
Metabolismo de aminoácidos	3,83E-03-4,13E-02	CAT, PSTK, MCCC2	3
Producción de energía	3,83E-03-2,65E-02	STC1, PRKAG2, MDH1	3
Expresión génica	3,83E-03-3,02E-02	CTNNEB1, YWHAE, EIF4B	3
Metabolismo de ácidos nucleicos	3,83E-03-4,5E-02	CAT, PRKAG2, ACLY	3
Desarrollo de organismos	3,83E-03-3,02E-02	STC1, DISP1, CAT	3
Desarrollo y función del sistema renal y urológico	3,83E-03-4,13E-02	CTNNEB1, STC1, CAT	3
Mantenimiento y función celular	7,64E-03-4,87E-02	STC1, ITGAM, SYPL2	3
Desarrollo y función del sistema reproductivo	1,14E-02-4,5E-02	DOCK1, CAT, FIGLA	3
Señalización e interacción célula-a-célula	3,83E-03-4,5E-02	ITGAM, SNTA1	2
Crecimiento y proliferación celular	3,83E-03-4,87E-02	NR1D1, CAT	2
Desarrollo y función de tejido conectivo	3,83E-03-4,47E-02	CTNNEB1, STC1	2
Replicación, recombinación y reparación del ADN	3,83E-03-3,02E-02	CAT, KIF2C	2
Síntesis de proteínas	3,83E-03-4,13E-02	FARS2, PSTK	2
Metabolismo de drogas	7,64E-03-2,65E-02	CAT, SPR	2
Estructura y desarrollo del tejido linfóide	7,64E-03-3,77E-02	CTNNEB1, ITGAM	2
Desarrollo y función del sistema hematológico	1,14E-02-4,87E-02	STC1, ITGAM	2
Morfología de órganos	1,14E-02-2,65E-02	STC1, FIGLA	2
Tráfico del sistema inmune	1,52E-02-4,87E-02	STC1, ITGAM	2
Modificación post-transcripcional del ARN	1,52E-02-3,02E-02	FARS2, EIF4B	2
Presentación de antígenos	7,64E-03-3,39E-02	ITGAM	1
Ciclo celular	7,64E-03-2,65E-02	YWHAE	1
Modificación post-traducciona	7,64E-03-7,64E-03	CAT	1
Captación de radicales libres	1,14E-02-1,14E-02	CAT	1
Desarrollo y función de cabello y piel	1,52E-02-1,52E-02	ITGAM	1
Desarrollo y función del sistema hepático	1,9E-02-1,9E-02	ITGAM	1
Degradación de proteínas	1,9E-02-1,9E-02	CAT	1
Tráfico de ARN	2,28E-02-2,28E-02	EIF4B	1
Desarrollo embrionario	2,65E-02-2,65E-02	CAT	1
Hematopoyesis	4,5E-02-4,5E-02	ITGAM	1
Respuesta inmune mediada por células	4,87E-02-4,87E-02	ITGAM	1

Tabla 5: Categorías de funciones fisiológicas y moleculares de genes regulados por DETA-NO en las CMEs

		H181	
Categoría	p-value	Moléculas	Número de genes
Muerte celular	2,55E-04-3,12E-02	TLR1, TP33AIP1, PACRG, MSRB2, BARHL1, VIPR2, DIRAS3, UNC5B, FOXF3, TYMP, SLC22A6, GAD2, MERTK, IKZF2, RUNX2, CAMK2N1, PIWIL2, VAMP3, CSRN3, CCR2, ICOSLG, SOX4, PHIP, ATP5A1, PTCH1, PAWR, DBH, THBD, TCF3, ATAD2, ACVR1B, BAG4, MECOM, GRM7, TFAM, HELLS, PAX3, PPR2B2, PENK, DACHI, GNRH1, AGRN, ALOX5, RBBP4, AKAP12, GRM2, HTATIP2, ROS3, PTPN2, PTGER3, LRP6, PIAS1, EPHA4, DMD, TRADD, CDC88A, RIF1 (includes EG 295602), PIK3C3, POU2F3, EYA4, ORIK2, CASP8, LUC1L3, FLT1, ZIC1, GABBR1, SCIN, PRKCG, NBN, PRKCO, GFAM, TMEM107, SSTR2, LY9, C15orf63, ENO1, LAMA4, SATB1, BMP7, SH2D1B, TNFRSF15B, PRDM16, PPI19A, TAC4	84
Desarrollo celular	7,43E-05-3,12E-02	TLR1, PACRG, COPS2, WNT3, NFATC3, DIRAS3, SPA6, UNC5B, FOXF3, PRKQ2, DIO2, MERTK, IKZF4, RUNX2, PIWIL2, TOIF2, CHD1, CCR2, TMEM1, ICOSLG, SOX4, MLLT10, LMO4, HIST1H4A (includes others), NR2C2, MDD2, FYB, TCF3, ACVR1B, ONECUT1, ODF11, MECOM, ZNF238, TFAM, HELLS, PAX3, PENK, GNRH1, ALOX5, AGRN, UBE2I, OPR17, PKNOX1, PTPN2, PICALM, LRP6, PIAS1, EPHA4, C2orf65, ASPM, POU2F3, TDRD6, GDF10, CASP8, HSD17B4, HSF2BP, MORC1, FLT1, ZIC1, GABBR1, SCIN, SOX11, NBN, LAMA4, ENO1, SATB1, BMP7, ARFP21, TNFRSF13B, PRDM16, TAC4, DYRK1A, COPS2, MSRB2, TCF15, NFATC3, DIRAS3, FOXF3, IKZF2, IKZF4, RUNX2, TOIF2, CHD1, KLF12, CSRN3, HMGN5, SOX4, PHIP, MLLT10, LMO4, NR2C2, PAWR, MBD2, TCF3, ONECUT1, ACVR1B, MECOM, BACH1, ZNF238, TFAM, HELLS, SYTN2B, ZKSCAN3, BRWD1, PAX3, GNRH1, DACHI, AGRN, UBE2I, SNF5, HTATIP2, PKNOX1, NFIX, PICALM, PTGER3, ASMT, LRP6, PIAS1, ZNF219, DMD, TRADD, SEC61A1, MYSM1, POU2F3, MEQ3, CASP8, TCF20, HSF2BP, RPAIN, RSP1 (includes EG 233332), ZIC1, SOX11, LY9, ENO1, SATB1, BMP7, PRDM16, DYRK1A	72
Expresión génica	3,95E-08-3,12E-02	TLR1, COPS2, NFATC3, DIRAS3, FOXF3, PRKQ2, GAD2, IKZF2, MERTK, RUNX2, PIWIL2, CCR2, ICOSLG, SOX4, PHIP, ATP5A1, PTCH1, NR2C2, PAWR, MBD2, TCF3, TCF3, ATAD2, ODF11, MECOM, TFAM, ZKSCAN3, PAX3, PENK, GNRH1, DACHI, ALOX5, C2orf65, UBE2I, RBBP4, AKAP12, PTPN2, PIAS1, LRP6, PD3B, TRADD, CDC88A, CDCA7, PIK3C3, MEQ3, CASP8, FLT1, ZIC1, GABBR1, SCIN, SOX11, NBN, PRKCO, GFAM, SSTR2, LAMA4, SATB1, BMP7, TNFRSF13B, PRDM16, TAC4, SIRPO, DYRK1A	66
Crecimiento y proliferación celular	2,18E-03-3,12E-02	TLR1, COPS2, NFATC3, DIRAS3, FOXF3, PRKQ2, GAD2, IKZF2, MERTK, RUNX2, PIWIL2, CCR2, ICOSLG, SOX4, PHIP, ATP5A1, PTCH1, NR2C2, PAWR, MBD2, TCF3, TCF3, ATAD2, ODF11, MECOM, TFAM, ZKSCAN3, PAX3, PENK, GNRH1, DACHI, ALOX5, C2orf65, UBE2I, RBBP4, AKAP12, PTPN2, PIAS1, LRP6, PD3B, TRADD, CDC88A, CDCA7, PIK3C3, MEQ3, CASP8, FLT1, ZIC1, GABBR1, SCIN, SOX11, NBN, PRKCO, GFAM, SSTR2, LAMA4, SATB1, BMP7, TNFRSF13B, PRDM16, TAC4, SIRPO, DYRK1A	65
Desarrollo de tejidos	3,09E-03-3,12E-02	PACRG, BARHL1, WNT3, TCF15, NFATC3, DIRAS3, SPA6, TYMP, PRKQ2, DIO2, IKZF4, MERTK, RUNX2, PIWIL2, CCR2, SOX4, BMP2K, LMO4, ATP5A1, XYLT1, PTCH1, NR2C2, THBD, DBH, TCF3, ACVR1B, GDF11, ONECUT1, MECOM, PAX3, GNRH1, EMR2, AGRN, PKNOX1, NFIX, CABP4, PTGER3, PICALM, LRP6, HS2ST1, MYLK3, DMD, EPHA4, PHEX, C2orf65, TRADD, POU2F3, TDRD6, GDF10, CASP8, HSD17B4, HSF2BP, MORC1, FLT1, ZIC1, C2CD3, SOX11, NBN, LAMA4, ATRN, SATB1, SHMT1, BMP7	63
Desarrollo de organismos	2,37E-03-3,12E-02	COPS2, PACRG, BARHL1, TCF15, WNT3, NFATC3, DIRAS3, SPA6, TYMP, PRKQ2, DIO2, MERTK, RUNX2, PIWIL2, CCR2, SOX4, LMO4, PTCH1, NR2C2, TCF3, ONECUT1, ACVR1B, ODF11, MECOM, PAX3, GNRH1, PKNOX1, CABP4, PTGER3, HS2ST1, LRP6, EPHA4, C2orf65, TRADD, POU2F3, TDRD6, CASP8, HSD17B4, HSF2BP, MORC1, FLT1, ZIC1, C2CD3, GABBR1, SOX11, NBN, PRKCO, SSTR2, SATB1, SF3B1, SHMT1, BMP7, DYRK1A	52
Desarrollo y función del sistema hematológico	1,53E-04-3,12E-02	TLR1, NFATC3, VIPR2, FOXF3, CHST2, GAD2, IKZF2, MERTK, RUNX2, PIWIL2, CCR2, ICOSLG, SOX4, MLLT10, HIST1H4A (includes others), DDOST, PAWR, MBD2, TCF3, FYB, DBH, THBD, ACVR1B, ONECUT1, MECOM, HELLS, PENK, GNRH1, CXCR6, ALOX5, AGRN, UBE2I, PKNOX1, PTPN2, PICALM, EPHA4, DMD, TRADD, LYST, CASP8, FLT1, SCIN, NBN, GFAM, SATB1, BMP7, TNFRSF13B, PRDM16, SIRPO, TAC4	50
Desarrollo embrionario	2,37E-03-3,12E-02	PACRG, TPBG, COPS2, BARHL1, TCF15, WNT3, NFATC3, DIRAS3, SPA6, TYMP, DIO2, MERTK, RUNX2, PIWIL2, CCR2, SOX4, LMO4, PTCH1, NR2C2, TCF3, ONECUT1, ACVR1B, ODF11, MECOM, PAX3, GNRH1, PKNOX1, CABP4, PTGER3, HS2ST1, LRP6, EPHA4, C2orf65, TRADD, ASPM, POU2F3, TDRD6, CASP8, HSD17B4, HSF2BP, MORC1, FLT1, ZIC1, C2CD3, SOX11, NBN, SATB1, SF3B1, SHMT1, BMP7	50
Desarrollo de órganos	3,2E-03-3,12E-02	PACRG, PKNOX1, BARHL1, WNT3, TCF15, CABP4, PTGER3, NFATC3, DIRAS3, SPA6, LRP6, HS2ST1, EPHA4, TYMP, DIO2, C2orf65, TRADD, MERTK, RUNX2, PIWIL2, TDRD6, POU2F3, CCR2, CASP8, HSD17B4, HSF2BP, SOX4, LMO4, FLT1, MORC1, PTCH1, C2CD3, ZIC1, NR2C2, TCF3, SOX11, ODF11, ACVR1B, ONECUT1, PRKCO, NBN, MECOM, PAX3, SATB1, GNRH1, BMP7	46
Bioquímica de moléculas pequeñas	1,45E-03-3,12E-02	AKAP12, HTATIP2, GRM2, ROS3, VIPR2, PTGER3, DIRAS3, HS2ST1, EPHA4, TYMP, DIO2, SLC22A6, GAD2, LYST, RUNX2, PIK3C3, VAMP3, GRM6, FFR3, CASP8, HSD17B4, ALDH5A1, XYLT1, ATP5A1, GABBR1, NR2C2, SCIN, ARSA, DBH, PRKCG, SARDH, GRM7, GFAM, TFAM, SSTR2, PAX3, ROR, OPRK1, GNRH1, SHMT1, BMP7, ALOX5, ADH4 (includes EG 127)	43
Mantenimiento y función celular	6,23E-05-3,12E-02	AKAP12, TP33AIP1, PKNOX1, MSRB2, NFATC3, PICALM, SPA6, FOXF3, EPHA4, DMD, MERTK, RUNX2, PIK3C3, GABARAPL1, GRIK2, FFR3, CCR2, CASP8, ICOSLG, SOX4, MLLT10, FLT1, PTCH1, PAWR, ARSA, MBD2, DBH, THBD, TCF3, MECOM, KIAA0226, PRKCO, NBN, SATB1, PENK, SORCS2, GNRH1, BMP7, TNFRSF13B, CNH3, TAC4	41
Morfología de tejidos	6,7E-04-3,12E-02	NFIX, PTPN2, VIPR2, NFATC3, LRP6, SPA6, FOXF3, DMD, EPHA4, CHST2, GAD2, LYST, RUNX2, PIWIL2, PIK3C3, CCR2, CASP8, ICOSLG, LMO4, FLT1, PTCH1, SCIN, ARSA, TCF3, GDF11, ONECUT1, MECOM, NBN, TFAM, MYBP1, PAX3, SATB1, GNRH1, CXCR6, SHMT1, BMP7, ALOX5, TNFRSF13B, TAC4, DYRK1A, RBBP4	41
Desarrollo y función del sistema nervioso	2,52E-03-3,12E-02	COPS2, GRM2, NFIX, LRP6, DLG2, EPHA4, GAD2, ASPM, TOIF2, GRIK2, SV2C, CCR2, SOX4, LMO4, FLT1, ZIC1, GABBR1, ARSA, TCF3, SOX11, GDF11, NBN, PRKCG, GRM7, TFAM, LAMA4, PAX3, PENK, OPRK1, GNRH1, BMP7, ARFP21, ALOX5, AGRN, CNH3, DYRK1A	36
Señalización celular	2,22E-03-3,12E-02	AKAP12, LILRA1, GRM2, PTGER3, VIPR2, DIO2, DOK4, MERTK, RUNX2, GRM6, GRIK2, FFR3, CCR2, CASP8, MTSS1, FLT1, PTCH1, ZIC1, C2CD3, GABBR1, ACVR1B, GRM7, SSTR2, OPRK1, GNRH1, BMP7, AGRN, TNFRSF13B	29
Estructura y desarrollo del tejido linfoide	2,55E-04-3,12E-02	SOX4, PKNOX1, PTPN2, MLLT10, PICALM, NFATC3, FLT1, FOXF3, EPHA4, MBD2, TCF3, NBN, MERTK, RUNX2, PIWIL2, SATB1, PENK, GNRH1, CASP8, ICOSLG, TAC4	21
Desarrollo y función del sistema muscular y esquelético	2,37E-03-3,12E-02	BMP2K, NFIX, WNT3, LMO4, TCF15, FLT1, C2CD3, LRP6, PTCH1, DMD, SOX11, GDF11, PRKCO, MECOM, PHEX, ENO1, LAMA4, RUNX2, PAX3, GDF10, BMP7	21
Desarrollo y función del sistema cardiovascular	9,43E-03-3,12E-02	SOX4, TLR1, PTGER3, NFATC3, FLT1, LRP6, C2CD3, PTCH1, SOX11, MECOM, PRKCO, RUNX2, ENO1, LAMA4, PAX3, BMP7, CASP8, CCR2	18
Morfología de órganos	1,45E-03-3,12E-02	SOX4, PKNOX1, MLLT10, WNT3, PICALM, FLT1, ZIC1, C2CD3, LRP6, PTCH1, EPHA4, TYMP, SOX11, GDF11, PAX3, BMP7, DYRK1A	17
Desarrollo y función de tejido conectivo	6,54E-03-3,12E-02	BMP2K, NFIX, TCF15, LMO4, PTGER3, FLT1, LRP6, SOX11, GDF11, NBN, PHEX, RUNX2, PAX3, GNRH1, ODF10, BMP7, CCR2	17
Morfología celular	9,43E-03-3,12E-02	LPPR5, PTGER3, FLT1, FOXF3, SCIN, THBD, PRKCO, KIAA0226, LYST, MERTK, ESPN, ENO1, LAMA4, RUNX2, ATRN, BMP7, AGRN	17
Desarrollo y función del sistema reproductivo	3,71E-03-3,12E-02	PACRG, FLT1, MORC1, SPA6, NR2C2, MBD2, DBH, NBN, C2orf65, MERTK, PIWIL2, TDRD6, GNRH1, BMP7, HSD17B4, HSF2BP	16
Ciclo celular	1,45E-03-3,12E-02	RUNX2, CAMK2N1, ASPM, FLT1, ZIC1, PAWR, BMP7, DEGSI, GDF11, NBN	10

Tabla 6: Genes comunes entre CMEs de ratón y CMEs humanas tratadas con óxido nítrico

Símbolo	Nombre	CMEh	Condición	CMEr	Condición
AARSD1	alanyl-tRNA synthetase domain containing 1	1.231451359	Inducción	1.591206333	Represión
BRWD1	bromodomain and WD repeat domain containing 1	1.228038046	Represión	1.841162627	Represión
C15orf63	chromosome 15 open reading frame 63	1.291077747	Represión	1.708881826	Represión
C7orf68	chromosome 7 open reading frame 68	1.316102142	Inducción	1.599080806	Represión
ENO1	enolase 1, (alpha)	1.314794038	Inducción	1.383945431	Represión
GDF10	growth differentiation factor 10	1.263683456	Represión	1.572300197	Inducción
INO80D	INO80 complex subunit D	1.264077263	Represión	2.372136931	Inducción
KLF12	Kruppel-like factor 12	1.387633696	Represión	2.985917549	Inducción
LINC00116	long intergenic non-protein coding RNA 116	1.264531881	Represión	1.859581012	Represión
MCOLN1	mucopolisacárido 1	1.558809659	Inducción	1.384747653	Represión
MYBPC1	myosin binding protein C, slow type	1.272754885	Represión	1.20840444	Represión
OSBPL8	oxysterol binding protein-like 8	1.281552498	Represión	1.487059316	Inducción
PSMG4	proteasome (prosome, macropain) assembly chaperone 4	1.209317045	Represión	1.639540685	Represión
PTGER3	prostaglandin E receptor 3 (subtype EP3)	1.231814547	Inducción	1.298490387	Represión
RIF1 (includes EG-295602)	RAP1 interacting factor homolog (yeast)	1.29643783	Represión	2.689394917	Inducción
RSF1 (includes EG-233532)	remodeling and spacing factor 1	1.269668406	Represión	2.303970892	Inducción
RSPH4A	radial spoke head 4 homolog A (Chlamydomonas)	1.232042083	Represión	1.341784219	Inducción
SYNJ2BP	synaptotagmin 2 binding protein	1.287946709	Represión	2.332121403	Inducción
TCF3	transcription factor 3 (E2A immunoglobulin enhancer binding factors E12/E47)	1.208133378	Inducción	1.519767966	Represión
TCF20	transcription factor 20 (ARL)	1.325094272	Represión	1.375245477	Inducción
TMEM107	transmembrane protein 107	1.217824186	Represión	1.475957982	Represión
TMEM106C	transmembrane protein 106C	1.230448097	Represión	1.810027156	Represión
WAC	WW domain containing adaptor with coiled-coil	1.22914397	Represión	1.513772923	Inducción
ZKSCAN3	zinc finger with KRAB and SCAN domains 3	1.405790946	Represión	1.76960336	Inducción

Tabla 7: Genes de desarrollo y diferenciación regulados por DETA-NO en CMEs de ratón

Localización	Función	Genes
Inducidos		
Citoplasma	Estructura de proteínas	ADD2
	Unión a Actina/proteína	BCL2L11, DAB1, ENAH, MAP2, MAP6
	Enzima	BRA, GSK3B
	Transportador	KIF1B
Citoplasma, Mitocondria, membrana externa	Unión a proteína	BCL2#
Citoplasma, RE, Mitocondria	Enzima	EXT1#
Núcleo	Regulador transcripcional	BCL11B, CREB1, ELK1, INVS, PBX1#, POU2F2#, TAF4B, TCF12, IKZF3, MEIS2, HOXC6
		CHD7, MYCBP2, HIPK2
		Receptor nuclear dependiente de ligando
		RORC
Membrana plasmática	Receptor acoplado a proteína G	AGTR1
	Enzima/Quinasa	BMPR1A#, GNAQ
	Unión a Actina/proteína	EPB41, KRIT1, L1CAM
	Transportador	LRP2, SLC1A3, VLDLR
Espacio extracelular	Receptor transmembrana	ROBO2
	Enzima	C1GALT1
	Unión a proteína	WNT4, LAMB1, PRLR, FRAS1
Reprimidos		
Citoplasma	Peptidasa, Enzima. Quinasa, Fosfatasa	CASP9, CAT, CBS, GSR, PRKACA, PRKAR1A, PSME3, PTPN6, SPR, SRD5A2, NDRG1
Citoplasma, Mitocondria, membrana externa	Unión a proteína	BAK1, BAX
Citoplasma, Núcleo	Unión a proteína, Regulador transcripcional	CTNNB1P1
Citoplasma, Mitocondria, membrana externa	Quinasa	FES
	Unión a proteína de choque térmico	DNAJA3
Citoplasma, Membrana plasmática	Unión a proteína	FKBP8
	Unión a proteína	MARCKSL1
Núcleo	Regulador transcripcional	MXD3, MXI1, NEUROD1, PTTG1, STAT6, STAT5B#, TCF3#, VSX2, STAT2, TLE1 (Groucho1), AES (Tle5), E4F1
		CD C25B
		Receptor nuclear dependiente de ligando
		NR1D1, RARA#
Membrana plasmática	ADN demetilasa	FTO
	Unión a Actina/proteína	CFL1
	Transportador	AQP11
	Enzima/Quinasa	GNA13, RET
Espacio extracelular	Factor de crecimiento	CLEC11A#
	Unión a proteína	DEF6
	Citoquina	TNFSF9

#Self renewal genes

Tabla 8: Genes de desarrollo y diferenciación regulados durante el cultivo en ausencia de LIF en CMEs de ratón

Localización	Función	Genes
Inducidos		
Citoplasma	Unión a Actina/proteína	YWHAE, DOCK1, RASGRF1, HIP1R, MYL3, DRG1
	Enzima	ULK2, AHCY, CDC42BPA, CAT, SPR, IKBKB, FKBP1B, HSD17B4, STK36, GPAM
Citoplasma, Núcleo	Transportador	DOC2A
	Unión a proteína, Regulador transcripcional	CTNNBIP1
Núcleo	Regulador transcripcional	TP73, MXD1, HIST1H1E, CSDA, DMRT1
	Enzima/Quinasa	RPS6KA5, TNKS2
	Ciclo celular	CCND1, CABLES1, PES1
	Unión a Actina/proteína	WASF1
	Receptor nuclear dependiente de ligando	NR1D1
Membrana plasmática	Receptor acoplado a proteína G	OPRL1, AMPH, SMO
	Enzima/Quinasa	GNAZ, TRIO
	Unión a Actina/proteína	ITGAM
	Transmembrane	SYPL2, DISP1
Espacio extracelular	Enzima	STC1
	Factor de crecimiento	FGF11, GH1, EDA
Reprimido		
Citoplasma	Peptidasa, Enzima. Quinasa, Fosfatasa	BCR, DIO2, NAV1, POFUT1, HS3ST2, RSAD2, GAD2
	Enzima	EXT1, RTN4
Citoplasma, RE, Mitocondria		
Núcleo	Regulador transcripcional	NFIX, QKI, SOX9, BMI1, ARNTL, SMAD7, SATB2, ZBTB16, TBX6, ELK3, RREB1, HOXC6
	Unión a Actina/proteína	TACC1
Membrana plasmática	Receptor acoplado a proteína G	GABBR1
	Receptor transmembrana	NGFR, MARCO, CNPY2, IL6R, CEACAM1, SPRED1, CXADR
	canal iónico	SCN2A
	Unión a Actina/proteína	L1CAM, SYN3, PSEN1, SPRY4
Espacio extracelular	Enzima/Quinasa	TGFBR2
	Factor de crecimiento	BMP4, HBEGF, GDF10, JAG1, ANGPT2
	Unión a proteína	TIMP2, ADAMTS9

Table 9: Genes regulados por tratamiento con óxido nítrico involucrados en respuesta a hipoxia en CMEs de ratón

Símbolo	Nombre	Valor de expresión	Condición	Función
Pfkfb	phosphofructokinase, liver, B-type	2.45	Represión	Modificación post-traducciona
Ldhal6b	lactate dehydrogenase A-like 6B	1.43	Represión	Metabolismo
Ndr1	N-myc downstream regulated gene 1	4.06	Represión	Muerte celular, desarrollo celular
Stra13	stimulated by retinoic acid 13	2.02	Represión	Desarrollo celular, proliferación celular
Aldoc	aldolase 3, C isoform	3.51	Represión	Modificación post-traducciona
Ccng2	cyclin G2	1.99	Represión	Ciclo celular, proliferación celular
Ndr2	N-myc downstream regulated gene 2	3.14	Represión	Desarrollo celular, proliferación celular
Stc1	stanniocalcin 1	1.45	Represión	Muerte celular, desarrollo celular, proliferación celular
Tpi1	triosephosphate isomerase 1	1.79	Represión	Metabolismo, desarrollo celular
Anxa4	annexin A4	1.62	Represión	Muerte celular
Clcn5	chloride channel 5	1.58	Inducción	Actividad de canal cloruro controlado por voltaje
Socs2	suppressor of cytokine signaling 2	2.17	Inducción	Muerte celular, desarrollo celular, proliferación celular
Flnb	filamin, beta	2.86	Inducción	Adhesión focal
Ddit3	DNA-damage inducible transcript 3	2.30	Represión	Modificación post-traducciona, muerte celular, desarrollo celular, ciclo celular
Mxi1	MAX interactor 1	2.45	Represión	Regulador transcripcional, ciclo celular, crecimiento celular, proliferación celular
Gbe1	Glucan (1,4-alpha-), branching enzyme	2.10	Represión	Metabolismo
Hnrpl	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	2.36	Represión	Regulación traducciona
Tceb2	Transcription elongation factor B (Elongin B) (SIII), polypeptide 2	1.45	Represión	Regulador transcripcional, muerte celular, crecimiento celular
Mcc	Mutated in colorectal cancers	1.40	Inducción	Diferenciación celular
Ube2M	Ubiquitin-conjugating enzyme E2M	1.52	Represión	Metabolismo de proteínas
Cstf3	Cleavage stimulation factor	3.30	Inducción	Metabolismo de ARNm (splicing alternativo)
Rnf10	Ring finger protein 10	1.44	Represión	Proliferación celular, regulador transcripcional
Csnk1g1	Casein kinase 1, gamma 1	1.84	Inducción	Muerte celular, crecimiento celular
Gal3st1	Galactose-3-O-sulfotransferase 1	1.40	Represión	Metabolismo
Cdk2	Cyclin-dependent kinase 2	1.40	Represión	Ciclo celular, proliferación celular, muerte celular
Cyts	Cytochrome c, somatic	1.86	Represión	Muerte celular, Metabolismo mitocondrial
Ube2K	Ubiquitin-conjugating enzyme E2K	2.72	Inducción	Modificación post-traducciona, muerte celular, ciclo celular, desarrollo celular
Egln3	EGL nine homolog 3 (C. elegans) (HIF-prolyl hydroxylase 3)	2.08	Inducción	Proliferación celular, muerte celular, diferenciación celular
Egln1 (Phd2)	EGL nine homolog 1 (C. elegans) (HIF-prolyl hydroxylase 2)	2.59	Represión	Muerte celular, modificación post-traducciona, desarrollo celular
Arnt	Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator	1.59	Represión	Diferenciación celular, regulador transcripcional
Eif3k	Eukaryotic translation initiation factor 3	1.33	Represión	Regulador transcripcional, Regulador traducciona

Tabla 10: Lista de oligonucleótidos para PCR cuantitativa

Gen/Región	Secuencia	Amplicón	Gen/Región	Secuencia	Amplicón
Red Transcripcional			Remodelación de la cromatina		
Dax1 F1	CTCTGTGCAAAAGCTGTGAAGGCAT	200	Jarid2 F1	GGTGCAGGTACAAACAGTGCCAAA	150
Dax1 R2	AGCCAGTATGGAGCAGAGGGATT		Jarid2 R2	GTGGTGGTTGGTTTGGTTTCCTT	
Rex1 F1	CTGGATTTCAACTTGCGCACCCAT	151	Mbd5 F1	AAGACCTTGAGGTCAATCCAGCA	117
Rex1 R2	TTCAACATTTCTTCCCGGCTTTG		Mbd5 R2	ATGCAGCCTACACATCTACACGGT	
Esrrb F1	TCTTGGGCATGGCCAGTCTAGAAA	162	Mll3 F1	AGCATGTGCAGACCCCTATATGCCT	84
Esrrb R2	TOCTTCTTTCCGAGGTGCAATGA		Mll3 R2	TGTGACGATCTGTGCCACAAGAGA	
Zfx F1	TGGCCGGAAGATGTATCACTGTGA	200	Utx F1	AGAGGCTGAGATTGGCAGGTTCTT	90
Zfx R2	AGTACTGTTAGGGCAGGCCAATT		Utx R2	ATGCAGGCCACAATCTGTTCTCA	
Sal14 F1	TCTGGCCATGAAGACCAACGAGAT	116	Dnmt1 F1	ATAGCTACCGGTTCTTCGGCAACA	116
Sal14 R2	CGTCAAGCTTGGAAATCGTGCCAT		Dnmt1 R2	ACTGGACAGCAGGCAGCTTAAT	
mSin3A F1	AGGTGCTAGGCATAAAGCGAGACA	112	Chd8 F1	TCCCGCCAAAGCTCTATGATGAA	138
mSin3A R2	TTACCCAGCTTTCTCGGACATGGT		Chd8 R2	AGGCCATTCAAGGCTCTTTGTCT	
Zic1 F1	CCCTACCTTTGCAAGATGTGCGAT	70	Dnmt3b F1	GCACCTGGCAATTGTCACTTTGTCA	150
Zic1 R2	GGACCTTCATGTGTTTACGCAGAG		Dnmt3b R2	AGGGCTCCCAAGTATCAGAGGTTT	
Ronin F1	ACATCTTGGCCCTGATGGAAGTGA	149	Jmjd1b F1	CATTGTTGATGCATTGAAGCCGCC	97
Ronin R2	TCACATGCCGTGCTTCTTACGGAT		Jmjd1b R2	ACATTGGCCAAACAAGCAGGATG	
Zic3 F1	AACATGAACATGGCGGTGAA	272	Jmjd1c F1	TCATGATCTCTTCACCCGCAACAT	160
Zic3 R2	TACTTCGCTTGAAGCACTTGCCT		Jmjd1c R2	ACGAGACCTTCCCGGTGATGTAAT	
b-actn F1	TTCTCTTGGGTATGGAAT	199	Setd1b F1	TCCGACCGTACGCATGTGACATTT	147
b-actn R2	GAAGATCAAGATCATTGCTC		Setd1b R2	TCTAGGAGAAACAACCTGCTCGCT	
Creb1 F1	AATCTGGAGCAGACAACCAACGAGA	112	Ensayos de ChIP		
Creb1 R2	ATGGATACCTGGGCTAATGTGGCA		BracP F	TTGCGGGAGTTCAA GTGGAGC	
Dppa3 F1	GGAAAGTTCAAAGCGCTTTCCCAA	149	BracP R	CTCTCCACCTTCCAGGAGTCTTGA	218
Dppa3 R2	ATGGCTCACTGTCCCGTTTCAAACT		Oct4P F	CCGTCTGGAAGACACAGGCAGATA	
nmcy F1	TTCTCTCTTAACAAACAAAGCGGT	138	Oct4P R	ACCTAGGAGCGGTTTCAACCTCT	144
nmcy R2	TAGTTGTGCTGCTGATGGATGGGA		Nanog Proximal R	CCAAATCAGCCTATCTGAAG	
cmcyb F1	ACAGAACGGAAACAGACGACTGGAA	154	Nanog Proximal F	CCCTAAGCTTTCCTCCCTCC	150
cmcyb R2	GCTTGGCAATAACAGACCAACGCT				
cMyc F1	TGGTGTCTGTGGAAGAGGGCAAA	256			
cMyc R2	TTGAATGGACAGGATGTAGCGCGT				
FoxD3 F1	AGTGAAGCCGCTTACTCGTACAT	179			
FoxD3 R2	AGCAGTCGTTGAGTGAGAGGTTGT				
Validación del microarray					
Capns1 F1	AGCAGGATTCACCTGAATGAGCA	81			
Capns1 R2	TOGAAATCCATGTTCCCGCTCTCA				
Dnaja3 F1	TGGTGGCAGAACCATGGATAG	80			
Dnaja3 R2	TGGAAAGGAATCCCTCATTGTCTCTCC				
Bre F1	GTCTOCAGAAATTGCTTGAAACCG	83			
Bre R2	CATGGATCTTCCATTTTCGGACCA				
Casp9 F1	TGCTTTGTGTGGTCACTCTCTCT	101			
Casp9 R2	TTCTCAATGGACACGGAGCATCCA				
Bax F1	ACAGCAATATGGAGCTGCAGAGGA	140			
Bax R2	AGCAAAGTAGAAGAGGGCAACCA				
Parp1 F1	TTTAGCGGAGTACGCCAAGTCCAA	142			
Parp1 R2	TGGATGGTACCAAGGGTCAATCAT				
Casp7 F1	ATTCCAAGGTGCTGAAAGGCCAAC	86			
Casp7 R2	TGCTTTGCTATCCCTTCTCTGTCT				
Bak1 F1	TOGGAGATGATATTAAACCGCGCT	105			
Bak1 R2	AGGCGATCTTGTGTGAAGTTCGT				
Bcl2 F1	AATTGTAATTCATCTGCGCGCGCC	111			
Bcl2 R2	ACACTCCGCTTCACTGAGAATGT				
Birc6 F1	TATTGCAGAGAGACTGCCATGCT	83			
Birc6 R2	TTTCTGAGTGTGGAAAGCGATCA				
Pbx1 F1	CCCAAAGCGGCTCTGATTCTTTT	168			
Pbx1 R2	TTGCCTCTTTAGAGGATGGTGGGA				
Cdk6 F1	AATCCAGGCCAGCTGAGTTATGA	91			
Cdk6 R2	ACACACATACGATGCACACACAC				
Arhgap6 F1	AGAGGAACAACGATCTCGCTTCA	104			
Arhgap6 R2	ACTGAGCGACAAACGCTGTCAAGA				

Tabla 11: Lista de anticuerpos usados en los experimentos

Anticuerpos	Dilucion de trabajo	Fuente	Prueba
anti-H3K9me3	1:1000	Abcam	WB, ChIP
anti-H3K4me3	1:1000	Abcam	WB, ChIP
anti-H3K27me3	1:1000	Cell Signaling	WB, ChIP
anti-histone-H3 acetylated	1:1000	Calbiochem	WB
anti-histone-H4 acetylated	1:1000	Millipore	WB
anti- β -actin	1:10000	Sigma	WB
anti-Nanog	1:1000	Bethyl Laboratories	WB
anti-Oct4	1:1000	BD Transduction laboratories	WB
anti-SSEA-1	1:1000	Chemicon	WB IF
anti-SSEA-4	1:1000	Chemicon	WB IF
antimouse cleaved caspase-3 (Asp175)	1:1000	Cell Signaling	WB
polyclonal anti-mouse PARP	1:1000	Cell Signaling	WB
anti-rabbit IgG conjugated with peroxidase	1:30000	Sigma	WB
anti-mouse IgG conjugated with peroxidase	1:30000	Sigma	WB

Tabla 12: Sondas sin identificación precisa modificadas por óxido nítrico en CMEs

Identificador de Affymetrix	Símbolo	Nombre	Valor de cambio	Condición	Estado
1419886_at	DXEnd23e	DNA segment, Chr X, ERATO Doi 223, expressed	4.28051122	Increase	*
1419888_at	1110033M05Rik	RIKEN cDNA 1110033M05 gene	1.62454866	Increase	*
1420217_x_at	NA	NA	1.2811901	Decrease	NI
1425242_at	MGC7817	hypothetical protein LOC620031	2.96724282	Increase	*
1427819_at	NA	NA	1.41341096	Increase	NI
1430183_at	4833414E09Rik	RIKEN cDNA 4833414E09 gene	3.68885103	Increase	*
1430844_at	1700018M17Rik	RIKEN cDNA 1700018M17 gene	1.23419988	Decrease	*
1432009_at	4933415D12Rik	RIKEN cDNA 4933415D12 gene	1.28386533	Decrease	*
1432011_at	2900052L18Rik	RIKEN cDNA 2900052L18 gene	1.5736562	Decrease	*
1432470_at	1700016A09Rik	RIKEN cDNA 1700016A09 gene	1.25482498	Decrease	*
1435931_at	E130308A19Rik	RIKEN cDNA E130308A19 gene	2.0973684	Increase	*
1436322_a	2810001A02Rik	RIKEN cDNA 2810001A02 gene	1.61509445	Decrease	*
1436323_at	2810001A02Rik	RIKEN cDNA 2810001A02 gene	1.52009591	Decrease	*
1436864_at	A430090L17Rik	RIKEN cDNA A430090L17 gene	5.25412268	Increase	*
1437073_x	AV025504	expressed sequence AV025504	1.93297645	Decrease	*
1437493_at	5230400M03Rik	RIKEN cDNA 5230400M03 gene	1.56466973	Increase	*
1438259_at	NA	NA	2.91221908	Increase	NI
1438265_at	NA	NA	2.9994778	Increase	NI
1438412_at	NA	NA	1.91908294	Decrease	NI
1438788_at	D5W/su152e	DNA segment, Chr 5, Wayne State University 152, expressed	5.55932113	Increase	*
1438864_at	NA	NA	2.48489699	Increase	NI
1438882_at	NA	NA	1.60692936	Increase	NI
1439906_at	NA	NA	3.96156331	Increase	NI
1439191_at	NA	NA	3.62842478	Increase	NI
1439195_at	NA	NA	1.92990988	Increase	NI
1439216_at	BB211804	expressed sequence BB211804	4.05148096	Increase	*
1439298_at	NA	NA	2.51372192	Increase	NI
1439305_at	NA	NA	3.97872839	Increase	NI
1439311_at	B830012L14Rik	RIKEN cDNA B830012L14 gene	3.37477563	Increase	*
1439705_at	BB070754	expressed sequence BB070754	3.880014	Increase	*
1439852_at	NA	NA	3.6948473	Increase	NI
1439857_at	NA	NA	2.42239309	Increase	NI
1439926_at	NA	NA	3.16536884	Increase	NI
1440012_at	NA	NA	1.67598959	Increase	NI
1440320_at	NA	NA	3.15473623	Increase	NI
1440404_at	NA	NA	3.51152644	Increase	NI
1440430_at	A130004G07Rik	RIKEN cDNA A130004G07 gene	2.73128683	Increase	*
1440440_at	NA	NA	1.35070464	Increase	NI
1440461_at	O910001A06Rik	RIKEN cDNA O910001A06 gene	4.85311916	Increase	*
1440513_at	C80258	expressed sequence C80258	2.97078601	Increase	*
1440547_at	NA	NA	3.31592746	Increase	NI
1440567_at	D030051N19Rik	RIKEN cDNA D030051N19 gene	3.43272125	Increase	*
1440662_at	NA	NA	1.48319711	Increase	NI
1440760_at	NA	NA	1.49856244	Increase	NI
1440790_x_at	5033414K04Rik	RIKEN cDNA 5033414K04 gene	2.15880621	Increase	*
1440974_at	9030203C11Rik	RIKEN cDNA 9030203C11 gene	2.73890291	Increase	*
1441013_at	C81521	expressed sequence C81521	1.37628435	Increase	*
1441131_at	NA	NA	3.20421483	Increase	NI
1441303_at	NA	NA	1.21407372	Decrease	NI
1441349_at	LOC552904	hypothetical LOC552904	3.29682936	Increase	*
1441405_at	9630014M24Rik	RIKEN cDNA 9630014M24 gene	1.70924821	Increase	*
1441576_at	2410002O22Rik	RIKEN cDNA 2410002O22 gene	2.43786332	Increase	*
1441683_at	1110033M05Rik	RIKEN cDNA 1110033M05 gene	2.1146489	Increase	*
1441740_at	NA	NA	2.35819564	Increase	NI
1441843_s	5230400M03Rik	RIKEN cDNA 5230400M03 gene	2.77600024	Increase	*
1442041_at	LOC552876	hypothetical LOC552876	1.66489582	Increase	*
1442052_at	C330019G07Rik	RIKEN cDNA C330019G07 gene	2.79338129	Increase	*
1442057_at	AA986895	expressed sequence AA986895	1.90935202	Increase	*
1442126_at	5830417C01Rik	RIKEN cDNA 5830417C01 gene	3.39003204	Increase	*
1442276_at	NA	NA	1.27730052	Increase	NI
1442320_at	LOC553096	hypothetical LOC553096	2.88769571	Increase	*
1442470_at	NA	NA	5.65318725	Increase	NI
1442516_at	D2Entd623e	DNA segment, Chr 2, ERATO Doi 623, expressed	1.48574243	Increase	*
1442593_at	NA	NA	5.71060127	Increase	NI
1442880_at	NA	NA	1.3286987	Increase	NI
1442892_at	NA	NA	2.39378803	Increase	NI
1442955_at	NA	NA	1.52466074	Increase	NI
1443095_at	NA	NA	3.58559851	Increase	NI
1443104_at	NA	NA	4.47796918	Increase	NI
1443191_at	NA	NA	1.45232065	Increase	NI
1443253_at	NA	NA	1.66300347	Increase	NI
1443285_at	NA	NA	1.45666045	Increase	NI
1443405_at	NA	NA	1.25523604	Decrease	NI
1443429_at	E130310K16Rik	RIKEN cDNA E130310K16 gene	1.36080336	Increase	*
1443489_at	NA	NA	5.36648039	Increase	NI
1443526_at	NA	NA	4.11295108	Increase	NI
1443544_at	D18Entd653e	DNA segment, Chr 18, ERATO Doi 653, expressed	2.11754365	Increase	*
1443589_at	DXEntd42e	DNA segment, Chr X, ERATO Doi 242, expressed	1.37067941	Increase	*
1443739_at	NA	NA	3.07527436	Increase	NI
1443770_x	NA	NA	2.63753194	Increase	NI
1443959_at	9030203C11Rik	RIKEN cDNA 9030203C11 gene	2.28334303	Increase	*
1444130_at	1700081L11Rik	RIKEN cDNA 1700081L11 gene	2.90934875	Increase	*
1444194_at	NA	NA	4.53182606	Increase	NI
1444237_at	C330019G07Rik	RIKEN cDNA C330019G07 gene	2.52753084	Increase	*
1444244_at	NA	NA	1.29025637	Increase	NI
1444269_at	NA	NA	2.85968835	Increase	NI
1444343_at	A130064L14Rik	RIKEN cDNA A130064L14 gene	2.57808025	Increase	*
1444411_at	NA	NA	2.52218437	Increase	NI
1444515_at	NA	NA	1.37715622	Increase	NI
1444530_at	NA	NA	4.19174371	Increase	NI

* función poco descrita/conocida

NI No identificados

Tabla 12: Sondas sin identificación precisa modificadas por óxido nítrico en CMEs (continuación)

Identificador de			Valor de		
Affymetrix	Símbolo	Nombre	cambio	Condición	Estado
1444651_at	LOC553089	hypothetical LOC553089	2.39289997	Increase	*
1444722_at	NA	NA	4.0797363	Increase	NI
1444872_at	D3Erttd740e	DNA segment, Chr 3, ERATO Doi 740, expressed	4.39628321	Increase	*
1445001_at	NA	NA	2.65423504	Increase	NI
1445101_at	NA	NA	3.0462897	Increase	NI
1445135_at	NA	NA	2.5179243	Increase	NI
1445149_at	NA	NA	1.28730494	Increase	NI
1445154_at	3300002I08Rik	RIKEN cDNA 3300002I08 gene	1.40636226	Increase	*
1445196_at	C79595	expressed sequence C79595	1.33178009	Increase	*
1445256_at	NA	NA	1.47563364	Increase	NI
1445407_at	NA	NA	1.22614803	Decrease	NI
1445415_at	EG328191	predicted gene, EG328191	1.37150662	Increase	*
1445490_at	C77805	expressed sequence C77805	4.10981441	Increase	*
1445516_at	NA	NA	1.3871611	Increase	NI
1445689_at	NA	NA	3.18390223	Increase	NI
1445697_at	NA	NA	1.54541694	Increase	NI
1445919_at	AA409261	expressed sequence AA409261	2.2188206	Increase	*
1445931_at	NA	NA	1.25744828	Increase	NI
1445941_at	NA	NA	2.39167461	Increase	NI
1445965_at	NA	NA	2.27639807	Increase	NI
1445987_at	NA	NA	2.25649101	Increase	NI
1445999_at	D19Erttd132e	DNA segment, Chr 19, ERATO Doi 132, expressed	2.45557483	Increase	*
1446063_at	C730034F03Rik	RIKEN cDNA C730034F03 gene	1.33415743	Increase	*
1446094_at	NA	NA	2.67438254	Increase	NI
1446102_at	D9Erttd292e	DNA segment, Chr 9, ERATO Doi 292, expressed	1.29296155	Increase	*
1446118_at	D17Erttd165e	DNA segment, Chr 17, ERATO Doi 165, expressed	2.43127427	Increase	*
1446150_at	NA	NA	4.63447496	Increase	NI
1446230_at	Gm944	gene model 944, (NCBI)	1.92342924	Increase	*
1446296_at	4631422O05Rik	RIKEN cDNA 4631422O05 gene	3.90631399	Increase	*
1446304_at	NA	NA	5.13444582	Increase	NI
1446338_at	NA	NA	1.41892764	Increase	NI
1446345_at	NA	NA	3.62881155	Increase	NI
1446382_at	NA	NA	1.25905531	Increase	NI
1446453_at	NA	NA	1.31462617	Increase	NI
1446454_at	NA	NA	1.42643132	Increase	NI
1446537_at	NA	NA	1.64065779	Increase	NI
1446588_at	NA	NA	1.29933068	Increase	NI
1446592_at	NA	NA	3.73636013	Increase	NI
1446613_at	1190005F20Rik	RIKEN cDNA 1190005F20 gene	1.79364821	Increase	*
1446732_at	NA	NA	2.02409615	Increase	NI
1446799_at	NA	NA	1.6604214	Increase	NI
1446841_at	NA	NA	1.94384864	Increase	NI
1446921_at	NA	NA	2.69071972	Increase	NI
1446947_at	NA	NA	4.2835465	Increase	NI
1446972_at	D15Wsu126e	DNA segment, Chr 15, Wayne State University 126, expressed	4.26390852	Increase	*
1447094_at	NA	NA	1.89420365	Increase	NI
1447240_at	NA	NA	3.17605319	Increase	NI
1447341_at	D12Erttd551e	DNA segment, Chr 12, ERATO Doi 551, expressed	1.58998855	Increase	*
1447455_at	NA	NA	1.24978713	Increase	NI
1447984_at	D1Erttd75e	DNA segment, Chr 1, ERATO Doi 75, expressed	3.00166753	Increase	*
1449653_at	NA	NA	4.12035452	Increase	NI
1451948_at	Gm1409	gene model 1409, (NCBI)	1.34477168	Decrease	*
1452755_at	NA	NA	1.41275966	Decrease	NI
1453238_s_at	1200016E24Rik	RIKEN cDNA 1200016E24 gene	1.81064077	Increase	NI
1455510_at	NA	NA	2.0142246	Increase	NI
1456050_at	C80998	expressed sequence C80998	2.44033045	Increase	*
1456122_at	NA	NA	3.59055397	Increase	NI
1456659_at	LOC552902	hypothetical LOC552902	2.84236419	Increase	*
1456808_at	4933426M11Rik	RIKEN cDNA 4933426M11 gene	3.12850314	Increase	*
1456864_at	BC002059	cDNA sequence BC002059	2.71099534	Increase	*
1457016_at	NA	NA	1.27737385	Decrease	NI
1457153_at	LOC552882	hypothetical LOC552882	5.01235282	Increase	*
1457191_at	NA	NA	4.63922811	Increase	NI
1457202_at	NA	NA	1.28036236	Increase	NI
1457203_at	NA	NA	1.7503957	Increase	NI
1457297_at	A430081F14Rik	RIKEN cDNA A430081F14 gene	2.67210759	Increase	*
1457365_at	EG628262	predicted gene, EG628262	1.33976975	Increase	*
1457503_at	2310035C23Rik	RIKEN cDNA 2310035C23 gene	2.44835297	Increase	*
1457569_at	D8Erttd51e	DNA segment, Chr 8, ERATO Doi 51, expressed	4.21100003	Increase	*
1457597_at	NA	NA	1.41745855	Increase	NI
1457848_at	A930016P21Rik	RIKEN cDNA A930016P21 gene	2.45657162	Increase	*
1458061_at	LOC402769	hypothetical LOC402769	1.27927547	Increase	*
1458099_at	NA	NA	7.04511818	Increase	NI
1458110_at	D430030G11Rik	RIKEN cDNA D430030G11 gene	2.26751722	Increase	*
1458149_at	NA	NA	1.76425547	Increase	NI
1458309_at	NA	NA	3.30748996	Increase	NI
1458409_at	C86595	expressed sequence C86595	1.44623991	Increase	*
1458497_at	NA	NA	2.0772089	Increase	NI
1458543_at	NA	NA	1.22677549	Increase	NI
1458592_at	NA	NA	2.43553606	Increase	NI
1458645_at	NA	NA	1.35018144	Increase	NI
1458739_at	NA	NA	1.21468095	Increase	NI
1458886_at	NA	NA	1.4376577	Increase	NI
1458910_at	NA	NA	2.42012162	Increase	NI
1459089_at	RP23-292J1.1	hypothetical LOC545637	1.42270802	Decrease	*
1459183_at	OTTMUSG00000008561	predicted gene, OTTMUSG00000008561	1.3043529	Increase	*
1459202_at	NA	NA	1.94661773	Increase	NI
1459463_at	NA	NA	1.37766073	Increase	NI
1459537_at	4631427C17Rik	RIKEN cDNA 4631427C17 gene	3.76308294	Increase	*
1459595_at	NA	NA	2.970281	Increase	NI
1459632_at	NA	NA	3.62837496	Increase	NI
1459649_at	NA	NA	2.03165494	Increase	NI
1459671_at	NA	NA	1.74896815	Increase	NI
1459695_at	NA	NA	5.2345938	Increase	NI
1460133_at	NA	NA	1.59497284	Increase	NI
1460152_at	NA	NA	1.59454907	Increase	NI
1460745_at	A630038E17Rik	RIKEN cDNA A630038E17 gene	1.23282	Decrease	*

* función poco descrita/conocida

NI No identificados

Tabla 13: Genes con anotación funcional que modifican su expresión por óxido nítrico no incluidas significativamente en el análisis por IPA

Identificador de Affymetrix	Símbolo	Nombre	Valor de cambio	Condición
1441425_at	Arhgap6	Rho GTPase activating protein 6	7.41922061	Inducción
1443337_at	Grip1	glutamate receptor interacting protein 1	6.86911973	Inducción
1447143_at	Phf14	PHD finger protein 14	6.27495587	Inducción
1442067_at	Ror1	receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1	6.16536342	Inducción
1459009_at	Utrn	utrophin	5.90498926	Inducción
1456960_at	Adk	adenosine kinase	5.80111074	Inducción
1442473_at	Et14	enhancer trap locus 4	5.73118523	Inducción
1439301_at	Rad51l1	RAD51-like 1 (S. cerevisiae)	5.57417137	Inducción
1459374_at	Diap3	diaphanous homolog 3 (Drosophila)	5.36505834	Inducción
1440287_at	Nsmce2	non-SMC element 2 homolog (MMS21, S. cerevisiae)	5.22597801	Inducción
1457402_at	Suf1	sulfatase 1	5.18482083	Inducción
1444728_at	Exoc4	exocyst complex component 4	5.09959632	Inducción
1459635_at	Dlg1	discs, large homolog 1 (Drosophila)	4.97724569	Inducción
1439643_at	Acvr2a	activin receptor 1IA	4.95954773	Inducción
1456661_at	Jarid2	jumonji, AT rich interactive domain 2	4.8698725	Inducción
1439123_at	Phf21a	PHD finger protein 21A	4.65500155	Inducción
1442270_at	Pbx3	pre B-cell leukemia transcription factor 3	4.6470282	Inducción
1440030_at	Kcnt2	potassium channel, subfamily T, member 2	4.63965418	Inducción
1441771_at	Atrx	alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked homolog (human)	4.58708917	Inducción
1444746_at	Ptbp2	polypyrimidine tract binding protein 2	4.52755227	Inducción
1444856_at	Crebbp	CREB binding protein	4.3945616	Inducción
1456715_at	Phr1	pam, highwire, rpm 1	4.39055913	Inducción
1447156_at	Chm	choroideremia	4.378026	Inducción
1457908_at	Zfp407	zinc finger protein 407	4.34847222	Inducción
1446001_at	Reps1	RaBP1 associated Eps domain containing protein	4.16639098	Inducción
1441397_at	Pard3	par-3 (partitioning defective 3) homolog (C. elegans)	4.12445916	Inducción
1446421_at	Schip1	schwannomin interacting protein 1	4.12395985	Inducción
1446167_at	Chi314	chitinase 3-like 4	4.1067816	Inducción
1442671_at	Hip2	huntingtin interacting protein 2	4.09754932	Inducción
1439528_at	Pcm1	pericentriolar material 1	4.06677538	Inducción
1459734_at	Psmd14	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 14	4.05744037	Inducción
1447911_at	Tead1	TEA domain family member 1	4.01263411	Inducción
1437599_at	Chchd3	coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 3	3.98297455	Inducción
1443491_at	Ptprk	protein tyrosine phosphatase, receptor type, K	3.97697409	Inducción
1457723_at	Pspc1	paraspeckle protein 1	3.95981602	Inducción
1457945_at	Eif2s3y	eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 3, structural gene Y-linked	3.93351129	Inducción
1456159_at	Setd5	SET domain containing 5	3.91599703	Inducción
1444043_at	Gli3	GLI-Kruppel family member GLI3	3.83557663	Inducción
1443233_at	Gtf2f2	general transcription factor IIF, polypeptide 2	3.76107748	Inducción
1446240_at	Klc1	kinesin light chain 1	3.75496486	Inducción
1441435_at	Tbl1x	transducin (beta)-like 1 X-linked	3.74123588	Inducción
1443037_at	Nptn	neuroligin	3.73174251	Inducción
1443521_at	Ggnbp2	gametogenetin binding protein 2	3.70816287	Inducción
1441360_at	Rps6ka3	ribosomal protein S6 kinase polypeptide 3	3.6701235	Inducción
1442381_at	Mkln1	muskelin 1, intracellular mediator containing kelch motifs	3.62731586	Inducción
1456360_at	Ogn	osteoglycin	3.62473869	Inducción
1441718_at	Ubr5	ubiquitin protein ligase E3 component n-recognin 5	3.59852837	Inducción
1441155_at	Tmem161b	transmembrane protein 161B	3.58350507	Inducción
1458663_at	Large	like-glycosyltransferase	3.57843189	Inducción
1447165_at	Ankrd12	ankyrin repeat domain 12	3.57417293	Inducción
1441351_at	Ankib1	ankyrin repeat and IBR domain containing 1	3.56547196	Inducción
1441467_at	Tspan5	tetraspanin 5	3.55597767	Inducción
1443512_at	Spta5	spermatogenesis associated 5	3.54195124	Inducción
1458994_at	Csnk1g3	casein kinase 1, gamma 3	3.53502396	Inducción
1458721_at	Pcdhga12	protocadherin gamma subfamily A, 12	3.51763188	Inducción
1458637_x_at	Ube3c	ubiquitin protein ligase E3C	3.4942829	Inducción
1452500_at	Tmlhe	trimethyllysine hydroxylase, epsilon	3.46235525	Inducción
1447195_at	Elp4	elongation protein 4 homolog (S. cerevisiae)	3.45445161	Inducción
1458389_at	Klf7	Kruppel-like factor 7 (ubiquitous)	3.43892735	Inducción
1444458_at	Ctgef5	CTAGE family, member 5	3.41924359	Inducción
1442395_at	Dst	dystonin	3.37945812	Inducción
1446518_at	Rock1	Rho-associated coiled-coil containing protein kinase 1	3.37239547	Inducción
1440013_at	Trim44	tripartite motif-containing 44	3.35155026	Inducción
1443338_at	Ap2m1	adaptor protein complex AP-2, mu1	3.33379155	Inducción
1445379_at	Atp11c	ATPase, class VI, type 11C	3.32432926	Inducción
1438821_at	Rfwd2	ring finger and VWD repeat domain 2	3.28255469	Inducción
1447459_at	Aatf	apoptosis antagonizing transcription factor	3.27738811	Inducción
1445600_at	Igf1r	insulin-like growth factor I receptor	3.27679047	Inducción
1438084_at	Adam23	a disintegrin and metalloproteinase domain 23	3.27501988	Inducción

Tabla 13: Genes con anotación funcional que modifican su expresión por óxido nítrico no incluidas significativamente en el análisis por IPA (continuación)

Identificador de Affymetrix	Símbolo	Nombre	Valor de cambio	Condición
1442365_at	Rtn3	reticulon 3	3.23980313	Inducción
1441126_at	Farsb	phenylalanyl-tRNA synthetase, beta subunit	3.1803823	Inducción
1445200_at	Farp1	FERM, RhoGEF (Arhgef) and pleckstrin domain protein 1 (chondrocyte-derived)	3.14127284	Inducción
1441635_at	Olfml2a	olfactomedin-like 2A	3.11852439	Inducción
1444827_at	Etd9	BTB (POZ) domain containing 9	3.09194746	Inducción
1441612_at	Zfp148	zinc finger protein 148	3.06158243	Inducción
1442163_at	Hace1	HECT domain and ankyrin repeat containing, E3 ubiquitin protein ligase 1	3.05727422	Inducción
1438543_at	Spata13	spermatogenesis associated 13	3.04513284	Inducción
1445152_at	Cask	calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase (MAGUK family)	3.029142	Inducción
1446525_at	Gpc3	glypican 3	3.02398867	Inducción
1447421_at	Pam	peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase	2.99535749	Inducción
1457540_at	Slc25a26	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier, phosphate carrier), member 26	2.99069888	Inducción
1459170_at	Foxo1	forkhead box O1	2.98969992	Inducción
1446245_at	Fmn12	formin-like 2	2.96543247	Inducción
1442617_at	Cbfb	core binding factor beta	2.94223589	Inducción
1441437_at	Rbms1	RNA binding motif, single stranded interacting protein 1	2.92820891	Inducción
1456952_at	Arid1b	AT rich interactive domain 1B (Swi1 like)	2.91231125	Inducción
1440259_at	Man1a2	mannosidase, alpha, class 1A, member 2	2.89731789	Inducción
1459011_at	Uchl5	ubiquitin carboxyl-terminal esterase L5	2.86611838	Inducción
1444472_at	Snf1lk2	SNF1-like kinase 2	2.82932888	Inducción
1442056_at	Zfp608	zinc finger protein 608	2.78955938	Inducción
1445984_at	Ptk1	PFTARE protein kinase 1	2.77140808	Inducción
1442181_at	Grf1	glucocorticoid receptor DNA binding factor 1	2.75126702	Inducción
1443222_at	Akt3	thymoma viral proto-oncogene 3	2.74965394	Inducción
1456997_at	Ncoa5	nuclear receptor coactivator 5	2.74678776	Inducción
1444917_at	Ube2w	ubiquitin-conjugating enzyme E2W (putative)	2.72452679	Inducción
1457988_at	Sec63	SEC63-like (S. cerevisiae)	2.71333792	Inducción
1445527_at	Kpna3	karyopherin (importin) alpha 3	2.70284561	Inducción
1440304_at	Bach2	BTB and CNC homology 2	2.66001637	Inducción
1441263_at	Rfx3	regulatory factor X, 3 (influences HLA class II expression)	2.65802198	Inducción
1459442_at	Gnb1	guanine nucleotide binding protein, beta 1	2.6528181	Inducción
1440347_at	Arhgap10	Rho GTPase activating protein 10	2.63897526	Inducción
1445598_at	Galnt7	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine: polypeptide N-acetylglucosaminyltransferase 7	2.59827983	Inducción
1442241_at	Srpk2	serine/arginine-rich protein specific kinase 2	2.59623314	Inducción
1435046_at	Tmem98	transmembrane protein 98	2.57683528	Inducción
1446818_at	Mib1	mindbomb homolog 1 (Drosophila)	2.5687651	Inducción
1442422_at	Tmem55a	transmembrane protein 55A	2.56295977	Inducción
1446816_at	Dph4	DPH4 homolog (UJ3, S. cerevisiae)	2.56037354	Inducción
1442916_at	Psd3	pleckstrin and Sec7 domain containing 3	2.51954234	Inducción
1446649_at	Centd1	centaurin, delta 1	2.50982453	Inducción
1457553_at	Cugbp2	CUG triplet repeat, RNA binding protein 2	2.50760593	Inducción
1446138_at	Kifap3	kinesin-associated protein 3	2.4955358	Inducción
1459219_at	Rapgef2	Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 2	2.49174343	Inducción
1444693_at	Caenb2	calcium channel, voltage-dependent, beta 2 subunit	2.48207505	Inducción
1447060_at	Smyd3	SET and MYND domain containing 3	2.47800742	Inducción
1446223_at	Cox10	COX10 homolog, cytochrome c oxidase assembly protein, heme A: hemesynthetase (yeast)	2.46919295	Inducción
1457176_at	Garn1	GTPase activating RANGAP domain-like 1	2.46434537	Inducción
1447325_at	Foxn3	forkhead box N3	2.45728761	Inducción
1446158_at	Exocb6	exocyst complex component 6B	2.44809032	Inducción
1440052_at	Efrna5	ephrin A5	2.37284368	Inducción
1446892_at	Lrrc16	leucine rich repeat containing 16	2.3174799	Inducción
1458575_at	Setbp1	SET binding protein 1	2.27188473	Inducción
1445957_at	Evl	Ena-vasodilator stimulated phosphoprotein	2.20267192	Inducción
1447286_at	Emb1	embigin	2.16260462	Inducción
1441847_at	Mast2	microtubule associated serine/threonine kinase 2	2.15709375	Inducción
1459417_at	Zfp609	zinc finger protein 609	2.14595567	Inducción
1446332_at	Pcdhgc3	protocadherin gamma subfamily C, 3	2.13362345	Inducción
1459409_at	Ccdc109a	coiled-coil domain containing 109A	2.1303417	Inducción
1444943_at	Sh3rf1	SH3 domain containing ring finger 1	2.11615172	Inducción
1457591_at	Nol10	nucleolar protein 10	2.11142194	Inducción
1459571_at	Sh3bgr1	SH3-binding domain glutamic acid-rich protein like	2.09499238	Inducción
1446615_at	Shroom4	shroom family member 4	2.08412225	Inducción
1447615_at	Fmn1	formin 1	2.07352873	Inducción
1459948_at	Ghr	growth hormone receptor	2.05937345	Inducción
1458655_at	Vvtr1	VW domain containing transcription regulator 1	2.05069773	Inducción
1441472_at	Arid3b	AT rich interactive domain 3B (Bright like)	2.05029114	Inducción
1439651_at	Lmo4	LIM domain only 4	2.04532777	Inducción
1439929_at	Mfhas1	malignant fibrous histiocytoma amplified sequence 1	2.04075881	Inducción
1422993_s at	Retbp2	RNA and export factor binding protein 2	2.00966886	Represión

Tabla 14: Categorías funcionales obtenidas de los genes mostrados en Tabla 13

Categorías	Moléculas
Desarrollo de organismos	SULF1, WWTR1, RPS6KA3, RFX3, GPC3, CHM, TEAD1, ARID3B, GLI3, EFNA5, PHF14, IGF1R, UTRN, CEBF, IQCJ-SCHIP1, DLG1, Fmn1, PAM, LMO4, CREBBP, ATRX, DST, GRP1, ROR1, SHROOM4, ROCK1, OGN, RAPGEF2, GHR, FOXO1, MIB1, ARHGAP35, PARD3, ACVR2A
Morfología de Tejidos	SULF1, RPS6KA3, GPC3, CHM, TEAD1, ARID3B, GLI3, EFNA5, JARID2, IGF1R, UTRN, CEBF, DLG1, LMO4, PAM, CREBBP, DST, KIFAP3, RAPGEF2, KLF7, GHR, FOXO1, MIB1, ARHGAP35, ACVR2A
Señalización celular	KPNA3, LMO4, CREBBP, CASK, KIFAP3, GPC3, ZNF148, UBR5, GHR, GLI3, IGF1R, ARHGAP35, PARD3, ACVR2A
Modificación post-traducciona	KPNA3, ZNF148, CHM, LMO4, CREBBP, CASK, KIFAP3, PARD3
Síntesis de proteínas	KPNA3, ZNF148, DLG1, GHR, LMO4, CREBBP, GRP1, CASK, PARD3, KIFAP3
Organización y ensamble celular	EVL, SULF1, KLC1, AATF, WWTR1, DIAPH3, COX10, RPS6KA3, SPATA13, GNB1, EFNA5, IGF1R, UTRN, CACNB2, CEBF, DLG1, Fmn1, AP2M1, ARHGAP6, ARHGAP10, PTPRK, PAM, ATRX, DST, ROR1, SHROOM4, ROCK1, OGN, KLF7, RAPGEF2, GHR, PCM1, PARD3, RTN3
Función y Mantenimiento celular	EVL, SULF1, KLC1, COX10, WWTR1, DIAPH3, SPATA13, RPS6KA3, GNB1, SMYD3, GLI3, EFNA5, UTRN, IGF1R, AKT3, CEBF, CACNB2, Fmn1, DLG1, ARHGAP6, PTPRK, ARHGAP10, PAM, CREBBP, DST, ROR1, SHROOM4, ROCK1, GHR, KLF7, RAPGEF2, FOXO1, PCM1, ARHGAP35, PARD3, RTN3
Desarrollo y función del sistema muscular y esquelético	SULF1, Fmn1, DLG1, LMO4, CREBBP, RPS6KA3, GPC3, ROR1, ROCK1, TEAD1, GHR, GLI3, FOXO1, MIB1, UTRN, IGF1R, PHF14, AKT3, CACNB2, IQCJ-SCHIP1, ACVR2A
Desarrollo y función de tejido conectivo	SULF1, DLG1, Fmn1, LMO4, CREBBP, RPS6KA3, ROR1, GPC3, GHR, FOXO1, GLI3, PHF14, IGF1R, IQCJ-SCHIP1, ACVR2A
Desarrollo embrionario	SULF1, WWTR1, RPS6KA3, RFX3, GPC3, CHM, TEAD1, ARID3B, GLI3, EFNA5, UTRN, PHF14, IGF1R, IQCJ-SCHIP1, CEBF, DLG1, Fmn1, LMO4, ATRX, CREBBP, GRP1, ROR1, SHROOM4, ROCK1, OGN, KLF7, GHR, RAPGEF2, FOXO1, MIB1, ARHGAP35, PARD3, ACVR2A
Desarrollo de órganos	SULF1, WWTR1, RPS6KA3, RFX3, GPC3, TEAD1, GLI3, ARID3B, EFNA5, UTRN, IGF1R, PHF14, CEBF, IQCJ-SCHIP1, DLG1, Fmn1, LMO4, CREBBP, ATRX, GRP1, ROR1, SHROOM4, ROCK1, GHR, RAPGEF2, FOXO1, MIB1, ARHGAP35, PARD3, ACVR2A
Desarrollo de tejidos	SULF1, DIAPH3, WWTR1, RPS6KA3, RFX3, GPC3, GNB1, TEAD1, ARID3B, GLI3, EFNA5, IGF1R, UTRN, PHF14, CACNB2, CEBF, IQCJ-SCHIP1, Fmn1, DLG1, ARHGAP6, PTPRK, LMO4, CREBBP, ATRX, DST, GRP1, ROR1, SHROOM4, ROCK1, GHR, KLF7, RAPGEF2, FOXO1, MIB1, ARHGAP35, PARD3, RTN3, ACVR2A
Muerte celular y supervivencia	ROCK1, SRPK2, KLF7, PBX3, GLI3, FOXO1, MIB1, EFNA5, ADK, IGF1R, ARHGAP35, AKT3, SH3RF1, ACVR2A
Desarrollo y función del sistema digestivo	DLG1, RAPGEF2, GLI3, CREBBP, IGF1R, JARID2, RFX3, IQCJ-SCHIP1, CEBF, ACVR2A
Desarrollo y función del sistema nervioso	EVL, KLC1, SULF1, RPS6KA3, CHM, SRPK2, TEAD1, GLI3, EFNA5, UTRN, IGF1R, JARID2, AKT3, ADAM23, CACNB2, AP2M1, PTPRK, LMO4, CREBBP, ATRX, DST, KIFAP3, ROR1, SHROOM4, ROCK1, GHR, KLF7, RAPGEF2, PBX3, EXOC4, MIB1, ARHGAP35, PARD3, RTN3
Morfología de órganos	Fmn1, DLG1, SULF1, LMO4, ATRX, CREBBP, RPS6KA3, GRP1, KIFAP3, GPC3, ZNF148, CHM, TEAD1, GHR, RAPGEF2, KLF7, FOXO1, GLI3, EFNA5, IGF1R, AKT3, REMS1, ARHGAP35, ACVR2A
Desarrollo y función del sistema reproductivo	SULF1, DLG1, LMO4, ATRX, CREBBP, GPC3, ZNF148, CHM, GHR, RAPGEF2, IGF1R, REMS1, AKT3, IQCJ-SCHIP1, ACVR2A
Morfología celular	SULF1, BACH2, DIAPH3, WWTR1, SPATA13, SMYD3, EFNA5, IGF1R, AKT3, DLG1, AP2M1, PTPRK, CREBBP, DST, ROR1, ROCK1, EMB, OGN, KLF7, RAPGEF2, GHR, FOXO1, EXOC4, PCM1, ARHGAP35, PARD3, RTN3
Desarrollo celular	SULF1, PTPRK, PAM, LMO4, WWTR1, CREBBP, DST, GPC3, ROR1, ROCK1, GHR, RAPGEF2, KLF7, FOXO1, GLI3, MIB1, EFNA5, IGF1R, AKT3, CEBF, PARD3, RTN3
Expresión génica	BACH2, AATF, GTF2F2, WWTR1, RPS6KA3, RFX3, FARSF, GNB1, NCOA5, SRPK2, TEAD1, RFWD2, GLI3, JARID2, UCHL5, PSMD14, CEBF, PHF21A, PTPRK, LMO4, ATRX, CREBBP, ARID1B, GRP1, CASK, TBL1X, ROCK1, ZNF148, UBR5, KLF7, GHR, FOXO1, FOXN3, ELP4, ARHGAP35, PARD3, ACVR2A
Ciclo celular	EVL, SULF1, AATF, WWTR1, ATRX, CREBBP, RPS6KA3, RAD51B, SRPK2, RFWD2, NSMCE2, GHR, FOXO1, FOXN3, IGF1R
Replicación, recombinación y reparación del ADN	EVL, NSMCE2, ADK, ATRX, RAD51B
Interacción y Señalización célula a célula	DLG1, SULF1, ARHGAP6, AP2M1, PTPRK, LMO4, ROCK1, GNB1, GHR, FOXO1, PBX3, EFNA5, UTRN, IGF1R, CACNB2, PARD3
Compromiso celular	ROCK1, KLC1, GHR, FOXO1, DIAPH3, DST
Crecimiento y proliferación celular	SULF1, FOXO1, GLI3, WWTR1, CREBBP, IGF1R, RPS6KA3, AKT3, GPC3
Transporte molecular	DLG1, SLC25A26, KLC1, AP2M1, COX10, DST, GRP1, CASK, GPC3, KIFAP3, ROCK1, GHR, GLI3, EXOC4, ADK
Tráfico de proteínas	KLC1, DLG1, AP2M1, GHR, EXOC4, GLI3, DST, GRP1, CASK, KIFAP3
Metabolismo de carbohidratos	ROCK1, GALNT7, SULF1, AP2M1, TMEM55A
Desarrollo y función del sistema cardiovascular	DLG1, SULF1, PAM, CREBBP, ROR1, KIFAP3, ROCK1, CHM, TEAD1, GHR, RAPGEF2, GLI3, ARID3B, FOXO1, MIB1, IGF1R, AKT3, CEBF, PARD3, ACVR2A
Movimiento celular	KLF7, Chi33/Chi34, FOXO1, GLI3, EFNA5, DST, CEBF
Desarrollo y función del sistema hematológico	Chi33/Chi34, FOXO1, CREBBP, JARID2, CEBF
Metabolismo de lípidos	AP2M1, GHR, TMEM55A, IGF1R
Bioquímica de moléculas pequeñas	TMLHE, ROCK1, SULF1, AP2M1, GHR, TMEM55A, COX10, ADK, IGF1R, REMS1
Supervivencia de organismos	SULF1, LMO4, CREBBP, DST, RFX3, GRP1, GPC3, KIFAP3, GNB1, ZNF148, PBX3, FOXO1, MIB1, EFNA5, ADK, IGF1R, UTRN, ADAM23, ARHGAP35, AKT3, CACNB2

Bibliografia

VII. Referencias bibliográficas

1. Tesar PJ, Chenoweth JG, Brook FA, Davies TJ, Evans EP, Mack DL, Gardner RL, McKay RD: **New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells.** *Nature* 2007, **448**(7150):196-199.
2. Graf T, Stadtfeld M: **Heterogeneity of embryonic and adult stem cells.** *Cell Stem Cell* 2008, **3**(5):480-483.
3. Takahashi K, Yamanaka S: **Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors.** *Cell* 2006, **126**(4):663-676.
4. Cohen DE, Melton D: **Turning straw into gold: directing cell fate for regenerative medicine.** *Nat Rev Genet* 2011, **12**(4):243-252.
5. Robinton DA, Daley GQ: **The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy.** *Nature* 2012, **481**(7381):295-305.
6. Nichols J, Smith A: **Naive and primed pluripotent states.** *Cell Stem Cell* 2009, **4**(6):487-492.
7. Stadtfeld M, Maherali N, Breault DT, Hochedlinger K: **Defining molecular cornerstones during fibroblast to iPS cell reprogramming in mouse.** *Cell stem cell* 2008, **2**(3):230-240.
8. Young RA: **Control of the embryonic stem cell state.** *Cell* 2011, **144**(6):940-954.
9. Rizzino A: **Transcription factors that behave as master regulators during mammalian embryogenesis function as molecular rheostats.** *The Biochemical journal* 2008, **411**(2):e5-7.
10. Draper JS, Fox V: **Human embryonic stem cells: multilineage differentiation and mechanisms of self-renewal.** *Arch Med Res* 2003, **34**(6):558-564.
11. Pera MF, Tam PP: **Extrinsic regulation of pluripotent stem cells.** *Nature* 2010, **465**(7299):713-720.
12. Wang J, Rao S, Chu J, Shen X, Levasseur DN, Theunissen TW, Orkin SH: **A protein interaction network for pluripotency of embryonic stem cells.** *Nature* 2006, **444**(7117):364-368.
13. Efroni S, Duttagupta R, Cheng J, Dehghani H, Hoepfner DJ, Dash C, Bazett-Jones DP, Le Grice S, McKay RD, Buetow KH *et al*: **Global transcription in pluripotent embryonic stem cells.** *Cell Stem Cell* 2008, **2**(5):437-447.
14. Niwa H: **Open conformation chromatin and pluripotency.** *Genes Dev* 2007, **21**(21):2671-2676.

15. Tsumura A, Hayakawa T, Kumaki Y, Takebayashi S, Sakaue M, Matsuoka C, Shimotohno K, Ishikawa F, Li E, Ueda HR *et al*: **Maintenance of self-renewal ability of mouse embryonic stem cells in the absence of DNA methyltransferases Dnmt1, Dnmt3a and Dnmt3b.** *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 2006, **11**(7):805-814.
16. Bibikova M, Chudin E, Wu B, Zhou L, Garcia EW, Liu Y, Shin S, Plaia TW, Auerbach JM, Arking DE *et al*: **Human embryonic stem cells have a unique epigenetic signature.** *Genome research* 2006, **16**(9):1075-1083.
17. Bloushtain-Qimron N, Yao J, Shipitsin M, Maruyama R, Polyak K: **Epigenetic patterns of embryonic and adult stem cells.** *Cell Cycle* 2009, **8**(6):809-817.
18. Meshorer E, Yellajoshula D, George E, Scambler PJ, Brown DT, Misteli T: **Hyperdynamic plasticity of chromatin proteins in pluripotent embryonic stem cells.** *Dev Cell* 2006, **10**(1):105-116.
19. Kouzarides T: **Chromatin modifications and their function.** *Cell* 2007, **128**(4):693-705.
20. Marin-Husstege M, Muggironi M, Liu A, Casaccia-Bonnel P: **Histone deacetylase activity is necessary for oligodendrocyte lineage progression.** *J Neurosci* 2002, **22**(23):10333-10345.
21. Azuara V, Perry P, Sauer S, Spivakov M, Jorgensen HF, John RM, Gouti M, Casanova M, Warnes G, Merkenschlager M *et al*: **Chromatin signatures of pluripotent cell lines.** *Nat Cell Biol* 2006, **8**(5):532-538.
22. Bernstein BE, Mikkelsen TS, Xie X, Kamal M, Huebert DJ, Cuff J, Fry B, Meissner A, Wernig M, Plath K *et al*: **A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells.** *Cell* 2006, **125**(2):315-326.
23. Guenther MG, Frampton GM, Soldner F, Hockemeyer D, Mitalipova M, Jaenisch R, Young RA: **Chromatin structure and gene expression programs of human embryonic and induced pluripotent stem cells.** *Cell Stem Cell* 2010, **7**(2):249-257.
24. Gao H, Lukin K, Ramirez J, Fields S, Lopez D, Hagman J: **Opposing effects of SWI/SNF and Mi-2/NuRD chromatin remodeling complexes on epigenetic reprogramming by EBF and Pax5.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, **106**(27):11258-11263.

25. Kaji K, Nichols J, Hendrich B: **Mbd3, a component of the NuRD co-repressor complex, is required for development of pluripotent cells.** *Development* 2007, **134**(6):1123-1132.
26. Ho L, Crabtree GR: **Chromatin remodelling during development.** *Nature* 2010, **463**(7280):474-484.
27. Enikolopov G, Banerji J, Kuzin B: **Nitric oxide and Drosophila development.** *Cell Death Differ* 1999, **6**(10):956-963.
28. Peunova N, Scheinker V, Ravi K, Enikolopov G: **Nitric oxide coordinates cell proliferation and cell movements during early development of Xenopus.** *Cell Cycle* 2007, **6**(24):3132-3144.
29. Gouge RC, Marshburn P, Gordon BE, Nunley W, Huet-Hudson YM: **Nitric oxide as a regulator of embryonic development.** *Biol Reprod* 1998, **58**(4):875-879.
30. Kanno S, Kim PK, Sallam K, Lei J, Billiar TR, Shears LL, 2nd: **Nitric oxide facilitates cardiomyogenesis in mouse embryonic stem cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**(33):12277-12281.
31. Mujoo K, Sharin VG, Bryan NS, Krumenacker JS, Sloan C, Parveen S, Nikonoff LE, Kots AY, Murad F: **Role of nitric oxide signaling components in differentiation of embryonic stem cells into myocardial cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, **105**(48):18924-18929.
32. Ciani E, Severi S, Contestabile A, Bartesaghi R, Contestabile A: **Nitric oxide negatively regulates proliferation and promotes neuronal differentiation through N-Myc downregulation.** *J Cell Sci* 2004, **117**(Pt 20):4727-4737.
33. Bloch W, Fleischmann BK, Lorke DE, Andressen C, Hops B, Hescheler J, Addicks K: **Nitric oxide synthase expression and role during cardiomyogenesis.** *Cardiovasc Res* 1999, **43**(3):675-684.
34. Tsutsui M, Shimokawa H, Morishita T, Nakashima Y, Yanagihara N: **Development of genetically engineered mice lacking all three nitric oxide synthases.** *J Pharmacol Sci* 2006, **102**(2):147-154.
35. Mujoo K, Krumenacker JS, Murad F: **Nitric oxide-cyclic GMP signaling in stem cell differentiation.** *Free radical biology & medicine* 2011, **51**(12):2150-2157.
36. Mujoo K, Krumenacker JS, Wada Y, Murad F: **Differential expression of nitric oxide signaling components in**

- undifferentiated and differentiated human embryonic stem cells.** *Stem Cells Dev* 2006, **15**(6):779-787.
37. Sharin VG, Mujoo K, Kots AY, Martin E, Murad F, Sharina IG: **Nitric oxide receptor soluble guanylyl cyclase undergoes splicing regulation in differentiating human embryonic cells.** *Stem Cells Dev* 2010, **20**(7):1287-1293.
38. Tao Li J, Somasundaram C, Bian K, Xiong W, Mahmooduddin F, Nath RK, Murad F: **Nitric oxide signaling and neural stem cell differentiation in peripheral nerve regeneration.** *Eplasty* 2010, **10**:e42.
39. Danalache BA, Paquin J, Donghao W, Grygorczyk R, Moore JC, Mummery CL, Gutkowska J, Jankowski M: **Nitric oxide signaling in oxytocin-mediated cardiomyogenesis.** *Stem Cells* 2007, **25**(3):679-688.
40. Tejedo JR, Tapia-Limonchi R, Mora-Castilla S, Cahuana GM, Hmadcha A, Martin F, Bedoya FJ, Soria B: **Low concentrations of nitric oxide delay the differentiation of embryonic stem cells and promote their survival.** *Cell Death and Dis* 2010, **1**:e80.
41. Thomas DD, Ridnour LA, Isenberg JS, Flores-Santana W, Switzer CH, Donzelli S, Hussain P, Vecoli C, Paolocci N, Ambs S *et al*: **The chemical biology of nitric oxide: implications in cellular signaling.** *Free Radic Biol Med* 2008, **45**(1):18-31.
42. Mannick J: **Regulation of Cell Signaling by Protein Nitrosylation/Denitrosylation.** In: *Nitric oxide Cell Signaling, and Gene Expression* Edited by Santiago Lamas EC, vol. 1. Los Angeles, California: Taylor and Francis Group LLC; 2006: 430.
43. Nakamura T, Wang L, Wong CC, Scott FL, Eckelman BP, Han X, Tzitzilonis C, Meng F, Gu Z, Holland EA *et al*: **Transnitrosylation of XIAP regulates caspase-dependent neuronal cell death.** *Mol Cell* 2010, **39**(2):184-195.
44. Nott A, Watson PM, Robinson JD, Crepaldi L, Riccio A: **S-Nitrosylation of histone deacetylase 2 induces chromatin remodelling in neurons.** *Nature* 2008, **455**(7211):411-415.
45. Krumenacker JS, Katsuki S, Kots A, Murad F: **Differential expression of genes involved in cGMP-dependent nitric oxide signaling in murine embryonic stem (ES) cells and ES cell-derived cardiomyocytes.** *Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society* 2006, **14**(1):1-11.

46. Krumenacker JS, Murad F: **NO-cGMP signaling in development and stem cells.** *Mol Genet Metab* 2006, **87**(4):311-314.
47. Mora-Castilla S, Tejedo JR, Hmadcha A, Cahuana GM, Martin F, Soria B, Bedoya FJ: **Nitric oxide repression of Nanog promotes mouse embryonic stem cell differentiation.** *Cell Death Differ* 2010, **17**(6):1025-1033.
48. Spallotta F, Rosati J, Straino S, Nanni S, Grasselli A, Ambrosino V, Rotili D, Valente S, Farsetti A, Mai A *et al*: **Nitric oxide determines mesodermic differentiation of mouse embryonic stem cells by activating class IIa histone deacetylases: potential therapeutic implications in a mouse model of hindlimb ischemia.** *Stem Cells* 2010, **28**(3):431-442.
49. Tejedo JC, GM; Bedoya, FJ; Tapia-Limonchi, R **Embryonic Stem Cells: The Role of Nitric Oxide in Regulating Cell Differentiation, Self-Renewal, and Apoptosis**, vol. Volume 3. NJ, USA: Springer; 2012.
50. Gassanov N, Jankowski M, Danalache B, Wang D, Grygorczyk R, Hoppe UC, Gutkowska J: **Arginine vasopressin-mediated cardiac differentiation: insights into the role of its receptors and nitric oxide signaling.** *J Biol Chem* 2007, **282**(15):11255-11265.
51. Miao L, Wang M, Yin WX, Yuan Q, Chen YX, Fleischmann B, Hescheler J, Ji G: **Atrial natriuretic peptide regulates Ca channel in early developmental cardiomyocytes.** *PLoS One* 2010, **5**(1):e8847.
52. Madhusoodanan KS, Murad F: **NO-cGMP signaling and regenerative medicine involving stem cells.** *Neurochem Res* 2007, **32**(4-5):681-694.
53. Adamo L, Naveiras O, Wenzel PL, McKinney-Freeman S, Mack PJ, Gracia-Sancho J, Suchy-Dicey A, Yoshimoto M, Lensch MW, Yoder MC *et al*: **Biomechanical forces promote embryonic haematopoiesis.** *Nature* 2009, **459**(7250):1131-1135.
54. Contestabile A: **Regulation of transcription factors by nitric oxide in neurons and in neural-derived tumor cells.** *Prog Neurobiol* 2008, **84**(4):317-328.
55. Nott A, Riccio A: **Nitric oxide-mediated epigenetic mechanisms in developing neurons.** *Cell Cycle* 2009, **8**(5):725-730.
56. Xu RH, Chen X, Li DS, Li R, Addicks GC, Glennon C, Zwaka TP, Thomson JA: **BMP4 initiates human embryonic stem cell**

- differentiation to trophoblast. *Nat Biotechnol* 2002, **20**(12):1261-1264.
57. Zhao T, Xu Y: **p53 and stem cells: new developments and new concerns.** *Trends Cell Biol* 2010, **20**(3):170-175.
 58. Kim KM, Kim PK, Kwon YG, Bai SK, Nam WD, Kim YM: **Regulation of apoptosis by nitrosative stress.** *Journal of biochemistry and molecular biology* 2002, **35**(1):127-133.
 59. Kim YM, Chung HT, Simmons RL, Billiar TR: **Cellular non-heme iron content is a determinant of nitric oxide-mediated apoptosis, necrosis, and caspase inhibition.** *The Journal of biological chemistry* 2000, **275**(15):10954-10961.
 60. Choi BM, Pae HO, Jang SI, Kim YM, Chung HT: **Nitric oxide as a pro-apoptotic as well as anti-apoptotic modulator.** *J Biochem Mol Biol* 2002, **35**(1):116-126.
 61. Yamane T, Dylla SJ, Muijtjens M, Weissman IL: **Enforced Bcl-2 expression overrides serum and feeder cell requirements for mouse embryonic stem cell self-renewal.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, **102**(9):3312-3317.
 62. Pfaffl MW: **A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.** *Nucleic Acids Res* 2001, **29**(9):e45.
 63. Liu L, DiGirolamo CM, Navarro PA, Blasco MA, Keefe DL: **Telomerase deficiency impairs differentiation of mesenchymal stem cells.** *Exp Cell Res* 2004, **294**(1):1-8.
 64. Ma DK, Jang MH, Guo JU, Kitabatake Y, Chang ML, Pow-Anpongkul N, Flavell RA, Lu B, Ming GL, Song H: **Neuronal activity-induced Gadd45b promotes epigenetic DNA demethylation and adult neurogenesis.** *Science* 2009, **323**(5917):1074-1077.
 65. Tang Y, Luo Y, Jiang Z, Ma Y, Lin CJ, Kim C, Carter MG, Amano T, Park J, Kish S *et al*: **Jak/Stat3 signaling promotes somatic cell reprogramming by epigenetic regulation.** *Stem cells (Dayton, Ohio)* 2012, **30**(12):2645-2656.
 66. Carter GW: **Inferring network interactions within a cell.** *Brief Bioinform* 2005, **6**(4):380-389.
 67. Kim MO, Kim SH, Cho YY, Nadas J, Jeong CH, Yao K, Kim DJ, Yu DH, Keum YS, Lee KY *et al*: **ERK1 and ERK2 regulate embryonic stem cell self-renewal through phosphorylation of Klf4.** *Nature structural & molecular biology* 2012, **19**(3):283-290.

68. Davey RE, Onishi K, Mahdavi A, Zandstra PW: **LIF-mediated control of embryonic stem cell self-renewal emerges due to an autoregulatory loop.** *Faseb J* 2007, **21**(9):2020-2032.
69. Sekkai D, Gruel G, Herry M, Moucadel V, Constantinescu SN, Albagli O, Tronik-Le Roux D, Vainchenker W, Bennaceur-Griscelli A: **Microarray analysis of LIF/Stat3 transcriptional targets in embryonic stem cells.** *Stem Cells* 2005, **23**(10):1634-1642.
70. Zandstra PW, Jervis E, Haynes CA, Kilburn DG, Eaves CJ, Piret JM: **Concentration-dependent internalization of a cytokine/cytokine receptor complex in human hematopoietic cells.** *Biotechnol Bioeng* 1999, **63**(4):493-501.
71. Zandstra PW, Le HV, Daley GQ, Griffith LG, Lauffenburger DA: **Leukemia inhibitory factor (LIF) concentration modulates embryonic stem cell self-renewal and differentiation independently of proliferation.** *Biotechnol Bioeng* 2000, **69**(6):607-617.
72. Barbaric I, Gokhale PJ, Andrews PW: **High-content screening of small compounds on human embryonic stem cells.** *Biochem Soc Trans* 2010, **38**(4):1046-1050.
73. Desbordes SC, Placantonakis DG, Ciro A, Socci ND, Lee G, Djaballah H, Studer L: **High-throughput screening assay for the identification of compounds regulating self-renewal and differentiation in human embryonic stem cells.** *Cell Stem Cell* 2008, **2**(6):602-612.
74. Chen L, Yang M, Dawes J, Khillan JS: **Suppression of ES cell differentiation by retinol (vitamin A) via the overexpression of Nanog.** *Differentiation* 2007, **75**(8):682-693.
75. Ying QL, Nichols J, Chambers I, Smith A: **BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3.** *Cell* 2003, **115**(3):281-292.
76. Bhatia H, Sharma R, Dawes J, Khillan JS: **Maintenance of feeder free anchorage independent cultures of ES and iPS cells by retinol/vitamin A.** *J Cell Biochem* 2012.
77. Chen L, Khillan JS: **Promotion of feeder-independent self-renewal of embryonic stem cells by retinol (vitamin A).** *Stem Cells* 2008, **26**(7):1858-1864.
78. Chen L, Khillan JS: **A novel signaling by vitamin A/retinol promotes self renewal of mouse embryonic stem cells by activating PI3K/Akt signaling pathway via insulin-like growth factor-1 receptor.** *Stem Cells* 2010, **28**(1):57-63.

79. Sato H, Amagai K, Shimizukawa R, Tamai Y: **Stable generation of serum- and feeder-free embryonic stem cell-derived mice with full germline-competency by using a GSK3 specific inhibitor.** *Genesis* 2009, **47**(6):414-422.
80. Cahuana GM, Tejedo JR, Hmadcha A, Ramirez R, Cuesta AL, Soria B, Martin F, Bedoya FJ: **Nitric oxide mediates the survival action of IGF-1 and insulin in pancreatic beta cells.** *Cell Signal* 2008, **20**(2):301-310.
81. Cahuana GM, Tejedo JR, Jimenez J, Ramirez R, Sobrino F, Bedoya FJ: **Nitric oxide-induced carbonylation of Bcl-2, GAPDH and ANT precedes apoptotic events in insulin-secreting RINm5F cells.** *Exp Cell Res* 2004, **293**(1):22-30.
82. Tejedo JR, Cahuana GM, Ramirez R, Esbert M, Jimenez J, Sobrino F, Bedoya FJ: **Nitric oxide triggers the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt survival pathway in insulin-producing RINm5F cells by arousing Src to activate insulin receptor substrate-1.** *Endocrinology* 2004, **145**(5):2319-2327.
83. Hayashi T, Yano K, Matsui-Hirai H, Yokoo H, Hattori Y, Iguchi A: **Nitric oxide and endothelial cellular senescence.** *Pharmacol Ther* 2008, **120**(3):333-339.
84. Matsui-Hirai H, Hayashi T, Yamamoto S, Ina K, Maeda M, Kotani H, Iguchi A, Ignarro LJ, Hattori Y: **Dose-dependent modulatory effects of insulin on glucose-induced endothelial senescence in vitro and in vivo: a relationship between telomeres and nitric oxide.** *J Pharmacol Exp Ther* 2011, **337**(3):591-599.
85. Luo CX, Jin X, Cao CC, Zhu MM, Wang B, Chang L, Zhou QG, Wu HY, Zhu DY: **Bidirectional regulation of neurogenesis by neuronal nitric oxide synthase derived from neurons and neural stem cells.** *Stem Cells* 2010, **28**(11):2041-2052.
86. Grisham MB, Jourdain D, Wink DA: **Nitric oxide. I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation.** *Am J Physiol* 1999, **276**(2 Pt 1):G315-321.
87. Chung HT, Pae HO, Choi BM, Billiar TR, Kim YM: **Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis.** *Biochem Biophys Res Commun* 2001, **282**(5):1075-1079.
88. Kalmar T, Lim C, Hayward P, Munoz-Descalzo S, Nichols J, Garcia-Ojalvo J, Martinez Arias A: **Regulated fluctuations in**

- nanog expression mediate cell fate decisions in embryonic stem cells.** *PLoS Biol* 2009, **7**(7):e1000149.
89. Wang Z, Oron E, Nelson B, Razis S, Ivanova N: **Distinct lineage specification roles for NANOG, OCT4, and SOX2 in human embryonic stem cells.** *Cell Stem Cell* 2012, **10**(4):440-454.
 90. Babaie Y, Herwig R, Greber B, Brink TC, Wruck W, Groth D, Lehrach H, Burdon T, Adjaye J: **Analysis of Oct4-dependent transcriptional networks regulating self-renewal and pluripotency in human embryonic stem cells.** *Stem Cells* 2007, **25**(2):500-510.
 91. Sumi T, Tsuneyoshi N, Nakatsuji N, Suemori H: **Apoptosis and differentiation of human embryonic stem cells induced by sustained activation of c-Myc.** *Oncogene* 2007, **26**(38):5564-5576.
 92. Lubitz S, Glaser S, Schaft J, Stewart AF, Anastassiadis K: **Increased apoptosis and skewed differentiation in mouse embryonic stem cells lacking the histone methyltransferase Mll2.** *Mol Biol Cell* 2007, **18**(6):2356-2366.
 93. Trouillas M, Saucourt C, Duval D, Gauthereau X, Thibault C, Dembele D, Feraud O, Menager J, Rallu M, Pradier L *et al*: **Bcl2, a transcriptional target of p38alpha, is critical for neuronal commitment of mouse embryonic stem cells.** *Cell Death Differ* 2008, **15**(9):1450-1459.
 94. Wang YY, Deng X, Xu L, Gao F, Flagg T, May WS: **Bcl2 enhances induced hematopoietic differentiation of murine embryonic stem cells.** *Exp Hematol* 2008, **36**(2):128-139.
 95. Fujita J, Crane AM, Souza MK, Dejosez M, Kyba M, Flavell RA, Thomson JA, Zwaka TP: **Caspase activity mediates the differentiation of embryonic stem cells.** *Cell Stem Cell* 2008, **2**(6):595-601.
 96. Yao S, Chen S, Clark J, Hao E, Beattie GM, Hayek A, Ding S: **Long-term self-renewal and directed differentiation of human embryonic stem cells in chemically defined conditions.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, **103**(18):6907-6912.
 97. Amit M, Carpenter MK, Inokuma MS, Chiu CP, Harris CP, Waknitz MA, Itskovitz-Eldor J, Thomson JA: **Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture.** *Dev Biol* 2000, **227**(2):271-278.

98. Greber B, Lehrach H, Adjaye J: **Silencing of core transcription factors in human EC cells highlights the importance of autocrine FGF signaling for self-renewal.** *BMC Dev Biol* 2007, **7**:46.
99. Dressel R, Schindehutte J, Kuhlmann T, Elsner L, Novota P, Baier PC, Schillert A, Bickeboller H, Herrmann T, Trenkwalder C *et al*: **The tumorigenicity of mouse embryonic stem cells and in vitro differentiated neuronal cells is controlled by the recipients' immune response.** *PLoS One* 2008, **3**(7):e2622.
100. Boyer LA, Lee TI, Cole MF, Johnstone SE, Levine SS, Zucker JP, Guenther MG, Kumar RM, Murray HL, Jenner RG *et al*: **Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells.** *Cell* 2005, **122**(6):947-956.
101. Boiani M, Scholer HR: **Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005, **6**(11):872-884.
102. Liu Y, Labosky PA: **Regulation of embryonic stem cell self-renewal and pluripotency by Foxd3.** *Stem Cells* 2008, **26**(10):2475-2484.
103. Wu Q, Chen X, Zhang J, Loh YH, Low TY, Zhang W, Zhang W, Sze SK, Lim B, Ng HH: **Sall4 interacts with Nanog and co-occupies Nanog genomic sites in embryonic stem cells.** *J Biol Chem* 2006, **281**(34):24090-24094.
104. Yuri S, Fujimura S, Nimura K, Takeda N, Toyooka Y, Fujimura Y, Aburatani H, Ura K, Koseki H, Niwa H *et al*: **Sall4 is essential for stabilization, but not for pluripotency, of embryonic stem cells by repressing aberrant trophectoderm gene expression.** *Stem Cells* 2009, **27**(4):796-805.
105. Kelly VR, Xu B, Kuick R, Koenig RJ, Hammer GD: **Dax1 up-regulates Oct4 expression in mouse embryonic stem cells via LRH-1 and SRA.** *Mol Endocrinol* 2010, **24**(12):2281-2291.
106. Lim LS, Loh YH, Zhang W, Li Y, Chen X, Wang Y, Bakre M, Ng HH, Stanton LW: **Zic3 is required for maintenance of pluripotency in embryonic stem cells.** *Mol Biol Cell* 2007, **18**(4):1348-1358.
107. van den Berg DL, Zhang W, Yates A, Engelen E, Takacs K, Bezstarosti K, Demmers J, Chambers I, Poot RA: **Estrogen-related receptor beta interacts with Oct4 to positively regulate Nanog gene expression.** *Mol Cell Biol* 2008, **28**(19):5986-5995.
108. Zhang X, Zhang J, Wang T, Esteban MA, Pei D: **Esrrb activates Oct4 transcription and sustains self-renewal and**

- pluripotency in embryonic stem cells.** *J Biol Chem* 2008, **283**(51):35825-35833.
109. Toyooka Y, Shimosato D, Murakami K, Takahashi K, Niwa H: **Identification and characterization of subpopulations in undifferentiated ES cell culture.** *Development* 2008, **135**(5):909-918.
110. Scotland KB, Chen S, Sylvester R, Gudas LJ: **Analysis of Rex1 (zfp42) function in embryonic stem cell differentiation.** *Dev Dyn* 2009, **238**(8):1863-1877.
111. Masui S, Ohtsuka S, Yagi R, Takahashi K, Ko MS, Niwa H: **Rex1/Zfp42 is dispensable for pluripotency in mouse ES cells.** *BMC Dev Biol* 2008, **8**:45.
112. Park YK, Ahn DR, Oh M, Lee T, Yang EG, Son M, Park H: **Nitric oxide donor, (+/-)-S-nitroso-N-acetylpenicillamine, stabilizes transactive hypoxia-inducible factor-1alpha by inhibiting von Hippel-Lindau recruitment and asparagine hydroxylation.** *Mol Pharmacol* 2008, **74**(1):236-245.
113. Rahl PB, Lin CY, Seila AC, Flynn RA, McCuine S, Burge CB, Sharp PA, Young RA: **c-Myc regulates transcriptional pause release.** *Cell* 2010, **141**(3):432-445.
114. Brendeford EM, Andersson KB, Gabrielsen OS: **Nitric oxide (NO) disrupts specific DNA binding of the transcription factor c-Myb in vitro.** *FEBS Lett* 1998, **425**(1):52-56.
115. Hall CN, Garthwaite J: **What is the real physiological NO concentration in vivo?** *Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society* 2009, **21**(2):92-103.
116. Chan KK, Zhang J, Chia NY, Chan YS, Sim HS, Tan KS, Oh SK, Ng HH, Choo AB: **KLF4 and PBX1 directly regulate NANOG expression in human embryonic stem cells.** *Stem Cells* 2009, **27**(9):2114-2125.
117. Lu SC, Wu HW, Lin YJ, Chang SF: **The essential role of Oct-2 in LPS-induced expression of iNOS in RAW 264.7 macrophages and its regulation by trichostatin A.** *Am J Physiol Cell Physiol* 2009, **296**(5):C1133-1139.
118. Kaku H, Rothstein TL: **Octamer binding protein 2 (Oct2) regulates PD-L2 gene expression in B-1 cells through lineage-specific activity of a unique, intronic promoter.** *Genes Immun* 2010, **11**(1):55-66.
119. Cai T, Chen X, Wang R, Xu H, You Y, Zhang T, Lan MS, Notkins AL: **Expression of insulinoma-associated 2 (INSM2) in pancreatic islet cells is regulated by the transcription**

- factors Ngn3 and NeuroD1.** *Endocrinology* 2011, **152**(5):1961-1969.
120. Puligilla C, Dabdoub A, Brenowitz SD, Kelley MW: **Sox2 induces neuronal formation in the developing mammalian cochlea.** *J Neurosci* 2010, **30**(2):714-722.
121. Niwa H: **Wnt: what's needed to maintain pluripotency?** *Nat Cell Biol* 2011, **13**(9):1024-1026.
122. Becker KA, Ghule PN, Therrien JA, Lian JB, Stein JL, van Wijnen AJ, Stein GS: **Self-renewal of human embryonic stem cells is supported by a shortened G1 cell cycle phase.** *J Cell Physiol* 2006, **209**(3):883-893.
123. Zwaka TP, Thomson JA: **Differentiation of human embryonic stem cells occurs through symmetric cell division.** *Stem Cells* 2005, **23**(2):146-149.
124. Neganova I, Lako M: **G1 to S phase cell cycle transition in somatic and embryonic stem cells.** *J Anat* 2008, **213**(1):30-44.
125. Zhang X, Neganova I, Przyborski S, Yang C, Cooke M, Atkinson SP, Anyfantis G, Fenyk S, Keith WN, Hoare SF *et al*: **A role for NANOG in G1 to S transition in human embryonic stem cells through direct binding of CDK6 and CDC25A.** *J Cell Biol* 2009, **184**(1):67-82.
126. Cui X, Zhang J, Ma P, Myers DE, Goldberg IG, Sittler KJ, Barb JJ, Munson PJ, Cintron Adel P, McCoy JP *et al*: **cGMP-independent nitric oxide signaling and regulation of the cell cycle.** *BMC Genomics* 2005, **6**:151.
127. Levi BP, Morrison SJ: **Stem cells use distinct self-renewal programs at different ages.** *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2008, **73**:539-553.
128. Spivakov M, Fisher AG: **Epigenetic signatures of stem-cell identity.** *Nat Rev Genet* 2007, **8**(4):263-271.
129. Hemish J, Nakaya N, Mittal V, Enikolopov G: **Nitric oxide activates diverse signaling pathways to regulate gene expression.** *J Biol Chem* 2003, **278**(43):42321-42329.
130. Colussi C, Mozzetta C, Gurtner A, Illi B, Rosati J, Straino S, Ragone G, Pescatori M, Zaccagnini G, Antonini A *et al*: **HDAC2 blockade by nitric oxide and histone deacetylase inhibitors reveals a common target in Duchenne muscular dystrophy treatment.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, **105**(49):19183-19187.
131. Berchner-Pfannschmidt U, Yamac H, Trinidad B, Fandrey J: **Nitric oxide modulates oxygen sensing by hypoxia-inducible**

factor 1-dependent induction of prolyl hydroxylase 2. *J Biol Chem* 2007, **282**(3):1788-1796.